

A protein kináz D hatása a dendrittüskék aktin vázrendszerének stabilizálására és a tanulási folyamatokra

Doktori értekezés

Készítette: Bencsik Norbert

Témavezető: Dr. Schlett Katalin, PhD
habilitált egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola
Doktori iskolavezető: **Dr. Erdei Anna, PhD, DSc**

Ideg tudomány és humánbiológia program
Programvezető: **Dr. Détári László, PhD, DSc**

Idegi Sejtbiológia Kutatócsoport
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Élettani és Neurobiológiai Tanszék



2017

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke.....	6
3. Bevezetés.....	7
3.1. A serkentő szinapszisok általános felépítése.....	7
3.1.1. A preszinaptikus régió	7
3.1.2. A szinaptikus rés	9
3.1.3. A dendrittüskékben kialakuló posztszinaptikus régió	9
3.1.3.1. A dendrittüskék felfedezésének története.....	11
3.1.3.2. A dendrittüskék sejtalkotói	13
3.1.3.2.1. A sima felszínű endoplazmatikus retikulum	13
3.1.3.2.2. A tüskeapparátus	13
3.1.3.2.3. A mitokondriumok	13
3.1.3.2.4. A riboszómák és poliriboszómák.....	14
3.1.3.2.5. A reciklizáló endoszomális rendszer	14
3.1.3.3. A dendrittüskékben előforduló főbb molekuláris komponensek.....	14
3.1.3.3.1. A mikrotubuláris rendszer.....	14
3.1.3.3.2. Az aktin vázrendszer.....	14
3.1.3.3.3. A posztszinaptikus denzitás	18
3.1.3.3.4. A posztszinaptikus glutamáterg receptorok	20
3.1.3.3.5. A feszültségfüggő ioncsatornák.....	21
3.1.3.3.6. A proteaszomális rendszer	22
3.1.3.4. A dendrittüskék patológiás elváltozásai.....	23
3.2. A protein kináz D.....	24
3.2.1. A protein kináz D általános jellemzése	24
3.2.2. A protein kináz D szerkezete	25
3.2.3. A protein kináz D aktiválódásának mechanizmusai.....	25
3.2.4. A protein kináz D sejtélettani funkciói	27
3.2.4.1. A PKD géntranszkripciót befolyásoló hatása	27
3.2.4.2. A PKD által szabályozott jelátvitel és a sejtproliferációra gyakorolt hatása	28
3.2.4.3. A PKD hatása a sejtmozilitásra	28
3.2.4.4. A PKD aktivitás és a membránkörforgás irányítása közötti kapcsolat	29

3.2.4.5. A PKD aktivitás szerepe idegsejtekben	30
3.3. A neuronális plaszticitás	31
3.3.1. Új szinapszisok keletkezése	32
3.3.2. A szinaptikus plaszticitás	32
3.3.2.1. A rövid távú szinaptikus plaszticitás	32
3.3.2.2. A hosszú távú szinaptikus plaszticitás	32
3.3.2.3. A homeosztatikus plaszticitás	36
3.3.3. Viselkedés-élettani tesztek/módszerek a neurobiológiában	37
4. Célkitűzések	41
5. Anyagok és módszerek.....	42
5.1. A kísérletekhez használt állatok tartása	42
5.2. Sejtenyésztes	42
5.3. Transzfekció.....	43
5.4. A tenyészetekben alkalmazott plaszticitás-modellek.....	43
5.4.1. A glicinnel kiváltott kémiai LTP (GI-LTP).....	43
5.4.2. A tartós depolarizációval kiváltott homeosztatikus scaling	44
5.5. A tenyészetek feldolgozása	44
5.5.1. Immuncitokémia	44
5.5.2. Fluoreszcens fénymikroszkópia és a felvételek kvantitatív elemzése	44
5.6. Live-cell imaging felvételek készítése	46
5.7. A transzgén állatok hippocampusából készített preparátumok feldolgozása	46
5.7.1. Fénymikroszkópia	46
5.7.2. Elektronmikroszkópia.....	47
5.8. Viselkedés-élettani vizsgálatok.....	48
5.8.1. A vizsgálatokhoz használt állatok genotípusa	48
5.8.2. A nyílt porond teszt.....	48
5.8.3. Az új objektum felismerés teszt.....	49
5.8.4. A Morris-féle vízi labirintus teszt	49
5.8.5. A 8-karú sugárlabirintus teszt	50
5.9. Az adatok statisztikai elemzése	51
6. Eredmények	52
6.1. A tenyészetekben alkalmazott plaszticitási modellek hatása a dendrittüskék morfológiájára.....	52
6.1.1. A glicinnel kiváltott kémiai LTP (GI-LTP) során a dendrittüskék feje kiszélesedik	52

6.1.2. A hosszú idejű KCl kezelés hatására a dendrittüskék feje kiszélesedik	54
6.2. Az endogén PKD aktív a dendrittüskékben	54
6.2.1. Az endogén PKD aktivitás mikroszkópos meghatározása a dendrittüskékben	54
6.2.2. A glicinnel kiváltott kémiai LTP az endogén PKD aktiválódását váltja ki a dendrittüskékben	56
6.3. A PKD szabályozza az aktin vázrendszer dinamikáját a dendrittüskékben.....	58
6.3.1. A PKD aktivitás gátlása növeli a dendritikus filopódiumok in vitro motilitását	58
6.3.2. A dendrittüskékben az aktin vázrendszer dinamikájának egyik meghatározója az ADF/cofilin foszforiláltsági szintje	59
6.3.3. A dendrittüskékben az aktin vázrendszer átépülése a glicinnel kiváltott kémiai LTP során megváltozik.....	59
6.3.4. A hosszútávú KCl kezelés hatására bekövetkező cofilin-inaktivációban a PKD aktivitás is szerepet játszik	61
6.4. A PKD aktivitás a dendrittüskék eloszlását és morfológiáját is befolyásolja	62
6.4.1. A domináns-negatív kdPKD-EGFP mutáns expressziója megváltoztatja a dendrittüskék eloszlását és morfológiáját	62
6.4.2. A tartós depolarizáció hatására a dendrittüskék feje PKD-függő módon szélesedik ki	64
6.5. A hippocampusban termelődő domináns-negatív kdPKD-EGFP mutáns fehérje a CA1 és CA3 régióban is befolyásolja a dendrittüskék morfológiáját.....	66
6.6. A hippocampusban expresszáldó domináns-negatív PKD hatása az állati viselkedésre	68
6.6.1. A hippocampusban expresszáldó kdPKD-EGFP nem befolyásolja az egerek általános mozgásmintázatát	68
6.6.2. A hippocampusban expresszáldó kdPKD-EGFP az új objektum felismerés tesztben nincs hatással az egerek új tárgy felismerési képességére	68
6.6.3. A hippocampusban expresszáldó kdPKD-EGFP a hippocampus-dependens térbeli tanulási képességet és a memóriát jelentősen rontja	70
6.7. A dendritikus filopódiumok motilitásának elemzéséhez szükséges alkalmazás fejlesztése	73
6.7.1. A dendritikus filopódiumok/dendrittüskék motilitás meghatározásának háttere	73
6.7.2. A DFMA alkalmazás munkafolyamatának bemutatása	73
6.8. A viselkedés-élettani vizsgálatok során készített felvételek elemzéséhez szükséges alkalmazás fejlesztése.....	74
6.8.1. Az AnimalTracker alkalmazás bemutatása	74
6.8.2. Az AnimalTracker használata	75
7. Megvitatás	77

<i>7.1. A dendrittüskék fejének kémiai úton kiváltott kiszélesedése során a PKD aktiválódik.</i>	77
<i>7.2. A PKD az aktin stabilizációját szabályozza a dendrittüskékben</i>	80
<i>7.3. A kdPKD-EGFP expressziójának hatása az idegsejtek működésére és az állatok általános viselkedésére</i>	82
<i>7.4. A PKD aktivitás gátlásának hatása az állati tanulásra</i>	83
8. Összefoglalás	85
9. Summary	86
10. Köszönetnyilvánítás	87
11. Hivatkozások	88
12. A szerző publikációi	107

2. Rövidítések jegyzéke

AIS – axon iniciális szegmentum
AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazolo-4-propionsav
APV – amino-foszfonovaleriánsav
Arp2/3 komplex – aktin kapcsolt fehérje komplex 2/3
CaMKII α – kalcium/calmodulinfüggő protein kinázII α
DAG – diacil-glicerol
EB-3 – mikrotubuláris végkötő fehérje
ECS – extracelluláris tápfolyadék
GFP – zöld fluoreszcens fehérje
GI-LTP – glicinnel kiváltott LTP
HDAC – hiszton deacetiláz
LIMK – Lin11, Isl-1, Mec-3 1/2 kináz
LTD – hosszútávú depresszió
LTP – hosszútávú potencírozás
NMDA – N-metil-D-aszparaginsav
PDBu – forbol-12,13-dibutirát
PDZ domén – posztzinaptikus denzitás fehérje, Drosophila tumor szuppresszor, zonula occludens-1 fehérje domén
PH – pleckstrin homológia domén
PI4KIII β – foszfatidil-inozitol-4-kináz-III-béta
PIP₂ – foszfatidil-inozitol-difoszfát
PKA – protein kináz A
PKC – protein kináz C
PKD – protein kináz D
PLC – foszfolipáz C
PP1 – fehérje foszfatáz 1
PP2B – fehérje foszfatáz 2B
PSD – posztzinaptikus denzitás
PSD-95 – posztzinaptikus denzitás fehérje 95
RIN1 – Ras és Rab interaktor fehérje 1
SAP-90 – szinapszis kapcsolt fehérje 90
sER – sima felszínű endoplazmatikus retikulum
SSH – slingshot foszfatáz
TTX – tetrodotoxin
VGCC – feszültségfüggő kalcium csatorna
WASP – Wiskott-Aldrich szindróma fehérje

3. Bevezetés

A külvilágból érkező információk feldolgozására specializálódott szervünk az agyunk. Idegrendszerünket az idegsejtek és a gliasejtek között kialakuló, bonyolult kapcsolatrendszer alkotja. Egy idegsejt tízezernél is több idegsejttől kaphat bemenetet és akár több tízezer másikkal küldhet tovább információt. A neuronok közötti kapcsolatok erőssége állandóan változik, legnagyobb részük megszületésünk után stabilizálódik vagy eliminálódik. Ismert tény, hogy az Alzheimer-kórban szenvedő pácienseknél az idegsejtek számának csökkenését a szinaptikus kapcsolatok gyengülése és felbomlása előzi meg (Penzes és mtsai., 2011; Fiala és mtsai., 2002). A fenti folyamattal ellentétesen a tanulás és a memória kialakulásához elengedhetetlen a szinapszisok számának növekedése és a szinaptikus transzmisszió hatékonyságának emelése (Kasai és mtsai., 2010). A szinaptikus plaszticitás folyamata már régóta intenzíven kutatott terület az idegtudományban. A fenti jelenségek hátterének megismeréséhez az idegsejtek közötti kapcsolatokat sokkal részletesebben kell tanulmányozni.

3.1. A serkentő szinapszisok általános felépítése

A központi idegrendszerben az idegsejtek közötti információátvitelnek több formája létezik. A kommunikáció történhet elektromos szinapszisokon (gap junction) át, az idegsejtek az intersticiális folyadékon keresztül térfogati transzmisszióra is képesek, de a legjellemzőbb a kémiai szinapszisokon keresztüli információszállítás. A kémiai szinapszisok három jellegzetes régióból épülnek fel. A preszinaptikus régiót az axonvégződés alkotja, amelyből a felszabaduló neurotranszmitterek a szinaptikus résen keresztül jutnak el a posztzinaptikus régióhoz. A központi idegrendszerben a serkentő szinapszisokat többnyire a dendriteken, ott is leginkább a dendrittüskéken figyelhetjük meg, míg a gátló szinapszisok általában a neuronok sejttestjén és a proximális dendriteken alakulnak ki. A doktori dolgozatomban elsősorban a serkentő szinapszisok működésével foglalkozom, ezért ezek felépítését ismertetem részletesen.

3.1.1. A preszinaptikus régió

Az axonok a központi idegrendszerben eltérő módon alkotnak szinapszisokat. Az egyik típus jellemzője, hogy az axonok lefutásuk mentén varikozitásokat (kiöblösödések) alakítanak ki és ezek alkotnak szinapszisokat (en passant szinapszis¹). A másik típus jellemzője, hogy az axon terminális szélesedik ki és alakítja ki a preszinaptikus régiót (bouton szinapszis²).

¹ En passant francia eredetű szó. Jelentése: menet közben, elhaladóban.

² Bouton francia eredetű szó. Jelentése: gomb, rügy.

Sok esetben megfigyelhető, hogy a preszinaptikus boutonok többszörös szinapszist alakítanak ki.

A preszinaptikus régió központi helyén az aktív zóna áll, amelynek kulcsfontosságú szerepe van a szinaptikus transzmisszióban. A szinaptikus vezikulák az aktív zónához a dokkolás során kapcsolódnak. Az aktív zóna a preszinaptikus receptorok működését is szabályozza és a rövid- és hosszútávú preszinaptikus plaszticitásban is fontos szerepet tölt be. Az aktív zóna citoplazmatikus mátrixot (CAZ) több fehérjecsald építi fel. A Munc13 a szinaptikus vezikulák priming-jában játszik szerepet. A RIM (Rab3-kapcsolt molekula) és a RIM-BP (Rab3-kapcsolt molekulát kötő fehérje) fehérjék az aktív zóna központi tagjai, amelyek a fehérje-fehérje interakciókban fontosak. Az aktív zónához állványfehérjék is kapcsolódnak, mint a CASK (kalcium/calmodulin dependens szerin protein kináz) és a Velis. A szinaptikus transzmisszióban még a liprin, Piccolo/Bassoon, ELK (ETS domén tartalmú fehérje) multidomén fehérjecsaldok is szerepet játszanak (Südhof és Rizo, 2011).

A serkentő és gátló szinapszisok különböző típusú szinaptikus vezikulákat tartalmaznak. A glutamáterg szinapszisokra a kör alakú, kb. 35-40 nm átmérőjű vezikulák jellemzőek. Harris munkacsoportjának elektronmikroszkópos vizsgálata bizonyította, hogy a hippocampusz CA1 régiójában a serkentő szinapszisokban a vezikulák mérete és a posztzinaptikus régió területe jól korrelál (Harris és Stevens, 1989). A serkentő szinapszisok vezikulái azonban nem alkotnak homogén csoportot. A glutamáterg axonális varikozitásokban megjelenhetnek akár 80 nm átmérőjű, sötét magvú vezikulák is (dense-core vesicle; DCV) a szinapszis kialakulása során. A szinapszis érése során az aktív zóna membrán forrását a DCV-k biztosítják, ezt bizonyítja, hogy az érett preszinapsziszból ezek a vezikulák már hiányoznak (Harris és Weinberg, 2012). A gátló szinapszisokban a vezikulák kisebbek és inkább ovális alakúak.

A preszinapszisban a kialakulás során mikrotubulusok jelennek meg, amik az egyes membránkomponenseket a formálódó preszinaptikus régió területére irányítják. Jelenlétük átmeneti, a szinapszis érése során eltűnnek a preszinaptikus régióból és helyüket az aktin filamentumok veszik át. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a neurotranszmitterek felszabadulása során átmenetileg megnövekedő kalciumion szint depolimerizálja a mikrotubulusokat (Harris és Weinberg, 2012). Mitokondriumok nagy mennyiségben találhatóak a preszinapszis területén. A hippocampusz CA1-es régiójában a preszinaptikus boutonok 41 %-ban, a nagyobb varikozitások pedig kivétel nélkül tartalmaznak mitokondriumokat (Shepherd és Harris, 1998).

3.1.2. A szinaptikus rés

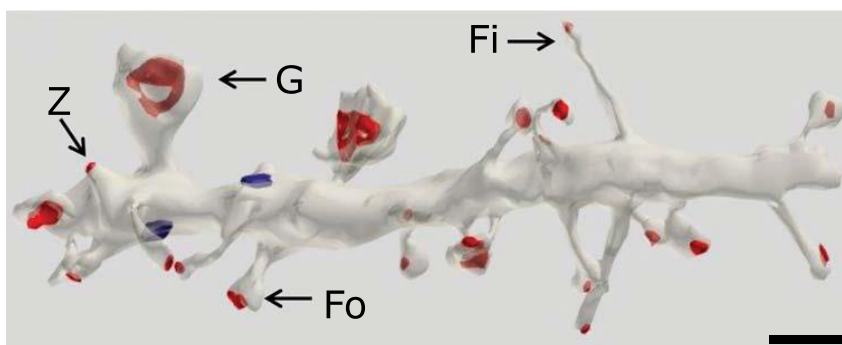
A preszinaptikus és a posztzinaptikus régiót a szinaptikus rés kapcsolja össze. A neuronális szinapszisokban a szinaptikus rés kb. 20 nm. Feladata, hogy fenntartsa a szinapszis szerkezetét és a szinaptogenezisben is fontos szerepet tölt be. A szinaptikus rés extracelluláris fehérjékben gazdag terület. Az egyed élete során a központi idegrendszerben az extracelluláris fehérjék összetétele jelentősen megváltozik. A fejlődő idegrendszerben a neurocan és versican-C extracelluláris fehérjék dominálnak. Az érett idegrendszerben a brevican, versican-R és a pentraxinok expressziója jelentős. A pentraxinok fontosak az AMPA-receptorok kihorgonyzásában (Barros és mtsai., 2011). A transzszinaptikus adhéziós molekulák, mint az NCAM-ek (neuronális sejtkapcsoló molekula), nektinek, α - és β -kateninek, neurexin/neuroigin molekulacsalád és az ephrinek/ephrin receptorok is jelentős alkotói a szinaptikus résznek (Südhof és Rizo, 2011; Harris és Weinberg, 2012).

3.1.3. A dendrittüskékben kialakuló posztzinaptikus régió

Az emberi agy serkentő szinapszisainak közel 90 %-a dendrittüskéken végződik. A dendrittüskék megnövelik a dendritek felszínét és biztosítják az idegsejtek közötti kommunikációt. Emellett fontos szerepet töltenek be a kalciumion szint puffereálásában és a kompartmentalizációban is (Yuste, 2010). Számítások szerint az ember központi idegrendszerében található dendrittüskék mennyisége a 10^{13} darabot is meghaladhatja. A dendrittüskék elsősorban a dendritágakon fordulnak elő, ezáltal a dendritek képesek szabályozni a dendrittüskékbe jutó jelek erősségét. A dendrittüskék megjelenése a sejttesten és az axon eredési dombon már patológiásnak tekinthető. A dendrittüskék a törzsfejlődés során már az örvényférgenél megjelennek (Sarnat és Netsky, 1985). A dendrittüskék alakjában, számában és méretében nagy heterogenitást figyelhetünk meg. Alakjuk nagyban függ az agyon belüli lokalizációjuktól. Ismert tény, hogy a kisagy Purkinje-sejtek dendrittüskéi vékony nyakkal és széles feji résszel rendelkeznek, úgynevezett „nyalóka” formájúak. A hippokampuszban a dendrittüskék morfológiája nagy heterogenitást mutat és a dendrittüskék gyakorisága jóval alacsonyabb, mint a kisagyban (Yuste, 2010). A dendrittüskék alak szerinti csoportosításával először az 1960-as évek végén Jones és Powell próbálkoztak. Ők két nagyobb csoportot különítettek el, a nyak nélküli tüskéket (*sessile*) és a nyakkal rendelkező tüskéket (*peduncular*) (Jones és Powell, 1969). Ezek a csoportok aztán tovább oszthatók a dendrittüskék feji részének morfológiája alapján. A fenti nomenklatúra kevésbé használatos manapság, a jelenlegi gyakorlatban Peters és kollégájának osztályozási rendszere elfogadottabb, akik a dendrittüskéket hosszúságuk, nyak- és fejszélességük alapján három fő típusra osztották (**I.**

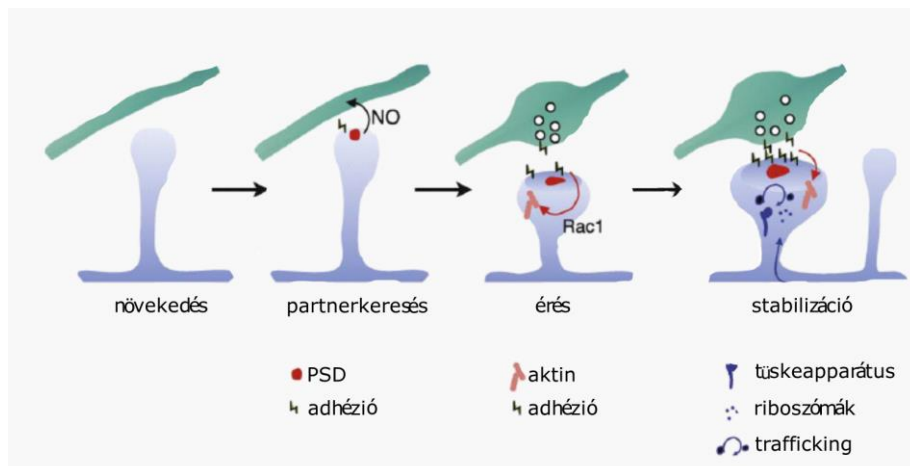
ábra) (Peters és Kaiserman-Abramof, 1970). Az első kategóriába a zömök tüskéket sorolták, amelyek átlagos hossza $1\ \mu\text{m}$ és hasonló a fej- és a nyakszélességük. A következő csoportba a kb. $1,7\ \mu\text{m}$ hosszúságú fonalas tüskék kerültek, amelyekben a fej- és a nyakszélesség szintén hasonló. A harmadik csoportba sorolhatóak a gomba morfológiájú tüskék, amelyek kb. $1,5\ \mu\text{m}$ hosszúságúak és széles fejjel rendelkeznek. Mindhárom típus kialakíthat szinapszist, de leggyakrabban a gomba morfológiájú dendritüskék specializálódtak erre.

A dendritüskék méretében fajok között és fajon belül, egyedi agyterületek között is jelentős eltérések mutatkoznak. Az emberi temporális nagyagykéreg piramissejtjeinek dendritüskéi nagyobbak, mint az egereké. Ebből a vizsgálatból kiderül, hogy az emberi dendritüskék fejének átlagos területe $0,59\ \mu\text{m}^2$, nyakának átlagos hosszúsága $0,94\ \mu\text{m}$, míg ezek az értékek az egerek esetében $0,31\ \mu\text{m}^2$ és $0,67\ \mu\text{m}$. Egy dendritüske térfogata hozzávetőlegesen $0,001\text{--}1\ \mu\text{m}^3$ között van (Benavides-Piccione és mtsai., 2002).



1. ábra A dendritüskék osztályozása morfológiájuk alapján. A piros szín jelzi a poszt-szinaptikus membrán alatti poszt-szinaptikus denzitást (PSD) a serkentő szinapszisokban. A kék szín a dendritágakra érkező gátló szinapszisokat jelzik. A zömök dendritüskéket (**Z**), a gomba tüskéket (**G**), a fonalas dendritüskéket (**Fo**) betűvel jeleztem. Az ábrán a dendritikus filopódiumok (**Fi**) jelöléssel láthatók. Mércé: $1\ \mu\text{m}$. (Harris és Weinberg, 2012. alapján).

A dendritikus filopódiumok a dendritüskéktől abban különböznek, hogy nem rendelkeznek stabil szinaptikus kapcsolattal (**1. ábra**). Az esetek nagy többségében nem tartalmazzák a PSD-t (poszt-szinaptikus denzitást) alkotó fehérjét, ami a dendritüskéktől való elkülönítés alapja. Morfológiájukat tekintve hasonló a fej- és nyakszélességük, de a hosszúságuk a szélességüknek akár többszöröse is lehet. A dendritikus filopódiumok dendritüskévé fejlődését a szakirodalom négy jellegzetes szakaszra osztja (**2. ábra**). Fejlődésük kezdeti szakaszában igen mozgékonyak, amely a preszinaptikus partner megtalálásához szükséges. Ilyen jellemző mozgásmintázat a bólogató mozgás, amelyre jellemző, hogy a fej és a nyak és/vagy a nyak és dendritág által közbezárt szög megváltozik; az elongáció, amely során a filopódiumok hossza rövidül és hosszabbodik, illetve a villásodás, amikor a filopódiumokon új hegyek jelennek meg (Yuste, 2010).



2. ábra A dendritikus filopódiumok dendrittüskévé fejlődésének sematikus ábrázolása. (Yoshihara, 2009. alapján).

A dendritikus filopódiumok fejlődésének egy pontján egyelőre még ismeretlen mechanizmusok következtében megváltozik a filopódiumok adhéziós molekula-profilja. Ez az első lépés a szinapszisok kialakulásához vezető úton. A dendritikus filopódiumokra jellemző telencephalinok helyett megnő a klasszikus adhéziós molekulák (neurexin/neurologin molekulacsalád és az ephrinek/ephrin receptorok) expressziója. Már ebben a fejlődési fázisban is kifejeződnek glutamátra érzékeny receptorok, amelyek a formálódó PSD-ben foglalnak helyet. A retrográd hírvivők (NO, arachidonsav származékai) is fontos szerepet töltenek be a leendő pre- és posztszinapszis kölcsönös formálódásában. A harmadik szakaszban a Rho kinázok (Rac1, RhoA és Cdc42) szerepe fontos, ugyanis szabályozzák a leendő tüskék aktin vázrendszerének dinamikáját. A negyedik szakaszra már egy stabilizált szinapszis alakul ki, amelyben a lokális fehérjeszintézishez szükséges sejtalkotók is megjelennek, tovább erősítve a szinapszis erősségét. Ha a dendritikus filopódiumok nem alakítanak ki szinapszist, lerövidülnek és visszahúzódnak a dendritágakba (Yoshihara és mtsai., 2009; Yuste, 2010).

3.1.3.1. A dendrittüskék felfedezésének története

Camillo Golgi 1873-ban fedezte fel a róla elnevezett festési eljárást (Golgi, 1873). A módszer alapja, hogy az ezüst-nitrát a kálium-dikromáttal reakcióba lép és a keletkező fekete színű ezüst-kromát csapadék kötődik a neuronok membránjához. A XIX. század végén már rendelkezésre álltak azok a technikai feltételek (megfelelő objektívek, camera lucida), amelyek használatával a megfestett szövettani metszetekről jó minőségű illusztrációkat lehetett készíteni.

Santiago Ramón y Cajal baszk származású hisztológus, patológus jól ismerte a Golgi-festést és a camera lucida technikát is, amelyet madridi tanulmányútja alatt sajátított el (Yuste, 2015). 1888-ban publikálta monográfiáját, amelyben a madarak kisagyi Purkinje-sejtjeiről közölt illusztrációkat (**3. ábra**) (Ramón y Cajal, 1888). Az idegsejtek dendritfáján kisméretű kinövéseket figyelt meg, amelyek a rózsa tüskéire emlékeztették, ezért az „*espina*”³ nevet adta nekik. A következő néhány évben számos publikációja jelent meg, ahol több fajban és különböző sejtípusokban is hasonló



3. ábra Cajal eredeti kézzel rajzolt illusztrációi a dendrittüskékről. (Yuste, 2015. alapján).

megfigyeléseket írt le. Eredményei a korszak idegtudós társadalmát megosztották. Pályatársai közül sokan (Berkley, Retzius és Schaffer) kiálltak Cajal megfigyelései mellett, de akadtak olyanok is (Dogiel és Golgi), akik úgy vélték, hogy a dendrittüskék a festés során keletkezett műtermékek. Cajal 1896-ban jelentette meg perdöntő publikációját, amelyben bizonyította a dendrittüskék létezését és reagált kollégáinak kételyeire (Ramón y Cajal, 1896). A következőket állapította meg:

- i. A dendrittüskék különböző festési eljárásokkal (Golgi, Cox, metilén-kék) is láthatóak.
- ii. A dendrittüskék sohasem vagy ritkán fordulnak elő a sejttesten és az axonon. A dendritfán az eloszlásuk változó.
- iii. A dendrittüskék nagyobb nagyítású objektívekkel sem tűnnek műterméknek.
- iv. A dendrittüskék nyaki régiója csak alkalmanként detektálható.
- v. A dendrittüskék létezése több fajban (macska, kutya, ember) és különböző sejtípusokban (nagyagykéreg piramissejtjei, hippocampusz szemcsesejtjei) is leírható (Yuste, 2010).

Cajal 1906-ban - Camillo Golgival megosztva - "az idegrendszer felépítésével kapcsolatos munkásságának elismeréséül" fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat kapott (Garcia-López és mtsai., 2007).

³ Az *espina* spanyol szó, jelentése: tüske.

3.1.3.2. A dendrittüskék sejtalkotói

3.1.3.2.1. A sima felszínű endoplazmatikus retikulum

A sima felszínű endoplazmatikus retikulum (sER) fontos szerepet tölt be a neuronok/dendrittüskék kalciumion/kloridion szintjének szabályozásában, de a vezikulák körforgásának irányításában is részt vesz. A sER a dendritfában egy hosszan szerveződő, vékony, tubuláris elrendezésű üregrendszert alkot, amely helyenként betüremkedik a dendrittüskék nyaki részébe. Ritkábban az is előfordul, hogy a tubulusok kiszélesednek és széles ciszternákat alkotnak (Cooney és mtsai., 2002). A sER membránjában lokalizált ryanodin és IP₃-receptorokon át a megfelelő szignál hatására kalcium lép ki a citoplazmába. A sER-be történő kalcium pumpálásért a szarko/endoplazmatikus retikulum ATPáz felelős. A sER üregrendszerében kalciumkötő fehérjék (kalszekvesztrin) vannak jelen, amelyek a kalciumion szint szabályozásában játszanak szerepet (Spacek és Harris, 1997). A hippokampális dendrittüskék esetében a tüskék kevesebb, mint 15 %-a tartalmaz sER-t (Harris és Weinberg, 2012).

3.1.3.2.2. A tüskeapparátus

A tüskeapparátus vázát két vagy több sER ciszterna alkotja, amelyekhez integráns membránfehérjék kapcsolódnak. A tüskeapparátus pontos funkciója még nem ismert, de valószínűsíthető, hogy az intracelluláris kalciumion szint szabályozásában és a fehérjék poszttranszlációs módosításában működik közre (Harris és Weinberg, 2012). Ezt támasztja alá, hogy poliriboszómák közvetlen szomszédságában gyakran fordul elő (Steward és Reeves, 1988).

3.1.3.2.3. A mitokondriumok

A mitokondriumok az eukarióta sejtekben mindamellett, hogy az ATP szintézisben szerepet játszanak, nagyon fontos szerepet töltenek be az intracelluláris kalciumion szint puffereelésében és az apoptózis folyamatában is. A mitokondriumok a teljes dendritágban megtalálhatók, de a hippokampusz CA1 régiójában és a nagyagykéregben a dendrittüskék feji részében is jelen vannak. Az LTP (long-term potentiation) kialakulása ATP igényes folyamat, a szinaptikus potencírozás alatt megváltozik a mitokondriumok dendritágon/dendrittüskéken belüli eloszlása. Azokon a területeken, ahol intenzív fehérjeszintézis szükséges, megnő a mitokondriumok száma (MacAskill és mtsai., 2010).

3.1.3.2.4. A riboszómák és poliriboszómák

A riboszómák többsége a dendritágakban található, kisebb részük helyezkedik el a dendrittüskékben, feladatuk a lokális fehérjeszintézis biztosítása. Az aktív fehérjeszintézist igénylő helyeken megnő a riboszómák mennyisége. A szabad poliriboszómák a citoplazmatikus fehérjék (CaMKII α (kalcium/calmodulinfüggő protein kinázII α), FMRP (törékeny X-szindróma fehérje, PSD-95 ((PSD-95, Dlg1, ZO-1)) szintéziséért felelősek, ezek mennyisége LTP stimulus alatt megnő (Harris és Weinberg, 2012).

3.1.3.2.5. A reciklizáló endoszomális rendszer

Az endoszomális rendszer az intracelluláris membrándinamika szabályozásában fontos szerepet tölt be. Tagjai szerepet játszanak a neuronális plaszticitásban és a polarizáltság kialakításában. Az NMDA-receptorok (N-metil-D-aszparaginsav) aktivációjának következtében a dendrittüskék feje kiszélesedik, ehhez a membrántöbbletet a reciklizáló vezikulák exocitózisa biztosítja (Park és mtsai., 2006). Az egyes sejtfelszíni receptorok a dendrittüskék laterális membrán doménjében, klatrin-mediált endocitózissal kerülnek vissza a dendrittüskékbe. Az endocitózis folyamata a PSD periferiáján történik meg. Ezt a területet endocitotikus zónának (EZ) nevezik. A folyamatot a klatrin, a dinamin és a syntaxin fehérjék szabályozzák. A reciklizáló endoszomális rendszer egyes tagjai (késői endoszómák/multivezikuláris testek) valószínűsíthetően részt vesznek a proteolízisben is, amely során a membránfehérjék egyes tagjai degradálódnak. Ez a lépés legjobban a sejtfelszíni AMPA-receptorkészlet (α -amino-3-hidroxi-5-metil-izoxazolo-4-propionsav) esetében vizsgált (Schmidt és Haucke, 2007).

3.1.3.3. A dendrittüskékben előforduló főbb molekuláris komponensek

3.1.3.3.1. A mikrotubuláris rendszer

Az idegsejtekben a mikrotubulusok a sejtpolaritás szabályozásában, az egyes sejtalkotók szállításában és az intracelluláris transzportfolyamatokban játszanak kitüntetett szerepet (Hoogenraad és Akhmanova, 2010). Az érett gomba morfológiájú dendrittüskékben nagyobb gyakorisággal és több ideig fordulnak elő a mikrotubulusok. Ez azt bizonyíthatja, hogy az érett dendrittüskék alakjának meghatározásában a mikrotubuláris rendszer is szerepet játszhat (Hu és mtsai., 2008).

3.1.3.3.2. Az aktin vázrendszer

A dendrittüskék vázát alkotó fő citoskeletális elem az aktin filamentum (Fifkova és Delay, 1982). A dendrittüskékben az aktin monomer formában (globuláris aktin, G-aktin) és

polimer (filamentáris aktin, F-aktin) formájában fordul elő. A filamentáris aktin szerveződése a nukleációs hely kialakításával kezdődik, ebben a folyamatban fontos szerepet tölt be az Arp2/3 komplex (aktin kapcsolt fehérje 2/3) (Pantaloni és mtsai., 2001). A dendrittüskékben az F-aktin szálak dinamikája és elrendeződése szabályozott. A filamentáris aktin egy polarizált struktúra, a posztzinaptikus membrán felé álló plusz végén (barbed end) az ATP kötött monomerek beépülnek, a dendrittüskék nyaki régiója felé álló mínusz végén (pointed end) pedig ADP-aktin lép ki. A dendrittüskéket felépítő aktin molekulák mikrodoménekbe rendeződnek. A dendrittüskék fejében, a beépülés helyén található a dinamikus aktin populáció, a nyaki régióban pedig a stabil aktin populáció. A dendrittüskék fejének kiszélesedésekor a dendritágból nagy mennyiségben áramlik aktin a beépülés helyére (ún. enlargement pool) (Honkura és mtsai., 2008).

Az aktin vázrendszer a dendrittüskék méretét és alakját is meghatározza (Hotulainen és Hoogenraad, 2010). Hatással van a dendrittüskék motilitására és fejlődésére is, éppen ezért az aktin váz megváltozása a szinaptikus kapcsolatok erősségét is befolyásolja (Harris és Weinberg, 2012). Az LTP során a G-aktin:F-aktin arány a filamentáris aktin irányába tolódik el, míg LTD (long-term depression) alatt, a depolimerizáció fokozódásával a G-aktin mennyisége nő meg (Okamoto és mtsai., 2004; Cingolani és Goda, 2008). Az aktin polimerizációja megnöveli a dendrittüskék fejét, de önmagában nem növeli a szinaptikus transzmisszió hatékonyságát, ehhez más struktúrális változásokra is szükség van (Halpain, 2000).

Az aktin a dendrittüskékben nem homogén struktúrájú. Az aktin filamentumokat morfológiájuk alapján két csoportra oszthatjuk: az elágazásmentes, kötegelt és az elágazó, filamentáris aktinra. Az érettebb, gomba morfológiájú dendrittüskék fejében az elágazó filamentáris aktin van nagyobb mennyiségben, a tüskék nyakában pedig az elágazásmentes aktin dominál. A dendritikus filopódiumokban szintén az elágazásmentes aktin található meg nagy mennyiségben (Korobova és Svitkina, 2010). Az aktin szálak közötti kötéserősség fontos a dendrittüskék plaszticitásfüggő változásaiban. Az aktin vázrendszer a dendrittüskék alapi részén nagyon stabil szerkezetű, a dinamikus aktin vázrendszer viszont a posztzinaptikus denzitás közelében lokalizált, így kisebb külső stimulusra is képes könnyen átrendeződni (Rácz és Weinberg, 2013).

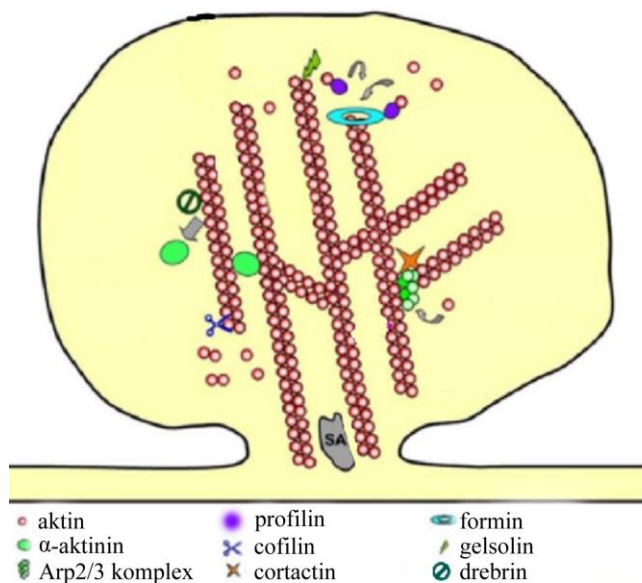
Az aktin dinamikáját számos stabilizáló és destabilizáló járulékos fehérje képes szabályozni. Ezek az aktinkötő fehérjék (actin binding protein; ABP) (**4. ábra**) a dendrittüskékben mikrodoménekbe rendeződve modulálják az aktin vázrendszer átalakulását (Rácz és Weinberg, 2013).

Az *Arp2/3* komplex hét alegységből épül fel (Arp2, Arp3, p16, p20, p21, p34 és p40), az aktin nukleációjában és új aktin elágazások

létrehozásában van szerepe. Legnagyobb mennyiségben a dendrittüskék periferiáján helyezkedik el (Rácz és Weinberg, 2013). Az *Arp2/3* működéséhez elengedhetetlen az *N-WASP* (neuronális Wiskott-Aldrich szindróma) fehérje és a *WAVE* (WASP-család verprolin homológia) fehérje aktivitása (Pantaloni és mtsai., 2001). Az *N-WASP* külső stimulus nélkül a citoplazmában, inaktívan helyezkedik el. Aktiválódása során a posztszinaptikus membránban PIP_2 -höz (foszfatidil-inozitol-difoszfát) asszociálódik és a *Cdc42* fehérjéhez kötődik (Pollard és Borisy, 2003). Az *N-WASP* és/vagy *Arp3* génkiütése a dendrittüskék számának csökkenéséhez vezet (Wegner és mtsai., 2008).

Az aktin nukleációját az *Arp2/3* komplex aktiválásán keresztül még a *cortactin* fehérje is segíti (Hering és Sheng, 2003). A *cortactin* a protein kináz D (PKD) fehérje a 298-as pozíciójú szerin oldalláncán keresztül képes foszforilálni, ezáltal annak aktivitását a 14-3-3 állványfehérjéhez való kötődés elősegítésével gátolja (Eiseler és mtsai., 2010) (**4. ábra**). A *cortactin* ezen felül képes asszociálódni az EB-3 (mikrotubuláris végkötő fehérje) fehérjéhez is. Az EB-3 egy mikrotubulusokhoz asszociálódó fehérje, amely a mikrotubulusok dinamikáját szabályozza. A *cortactin*-EB-3 kötődés fontos szabályozási lépés lehet az aktin vázrendszer és a mikrotubuláris rendszer kapcsolata között (Jaworski és mtsai., 2009). Az *Arp2/3* komplexen felül a *formin*ok is szabályozzák az aktin vázrendszer nukleációját. A konzervált FH-2 (formin homológia 2) domén az aktin nukleációját segíti elő, az FH-1 doménen keresztül pedig a profilinhez asszociálódhatnak. A *formin*ok alapállapotban inaktívak, aktiválódásukhoz Rho-GTPázokra van szükség (Zigmond, 2003).

Az aktin vázrendszer polimerizációjában fontos szerepet tölt be a *profilin*. A profilin

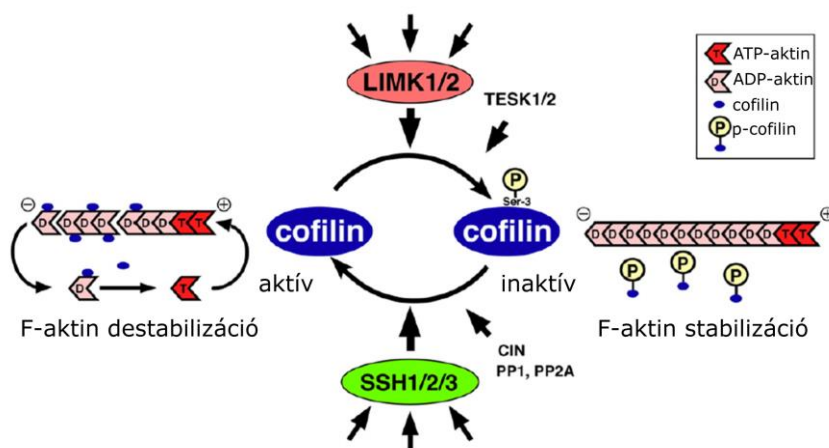


4. ábra Az aktin dinamikát meghatározó aktinkötő fehérjék funkcionális felosztása. (Lin és Webb, 2009. alapján).

az aktinon kötött GDP GTP-re történő cseréjét katalizálja. A profilin két izoformáját írták le: az I-es típus csak kis mértékben fejeződik ki a központi idegrendszerben, a II-es típus viszont nagy mennyiségben van jelen az agyban (Ackermann és Matus, 2003).

Az aktin vázrendszer dinamikájának szabályozásában a depolimerizáló molekulák is fontosak. Az egyik leghatásosabb aktin depolimerizáló faktor a *gelsolin*, amit a magas intracelluláris kalciumion szint aktivál, a lokálisan magas PIP₂ szint pedig gátol (Lin és Webb, 2009).

Az *aktin depolimerizáló faktor (ADF)/cofilin* (a továbbiakban: cofilin) fokozza az aktin átépülését és elősegíti az aktin filamentumok depolimerizációját. A cofilin képes a filamentáris aktin hasítására is, amely következtében új plusz végek alakulnak ki, amely a filamentumok növekedésének kedvez (Lin és Webb, 2009). A cofilin a dendrittüskék felszínéhez közel, a plazmamembránhoz közeli területén lokalizált, míg a dendrittüskék központi részén minimális mennyiségben fordul elő (Racz és Weinberg, 2006). A cofilin hármasszerin-jének (Ser3) foszforilációja a fehérje inaktiválódásához vezet, amelyért közvetlenül a LIM1/2-kinázok (Lim11, Isl-1, Mec-3 1/2 kináz) és a TES1/2-kinázok (tesztisz specifikus 1/2 kinázok) felelősek (**5. ábra**). A slingshot foszfatáz (SSH1/2/3) és egyéb foszfatáz (pl. fehérje foszfatáz 1 (PP1), fehérje foszfatáz 2 B (PP2B)) családok a cofilin defoszforilációjáért is felelősek, amely során a cofilin újra aktív lesz. Ez az aktin turnover növekedéséhez vezet (Mizuno, 2013).



5. ábra A cofilin foszforiláltságának mértéke szabályozza az aktin filamentumok turnover-t. (Mizuno, 2013. alapján).

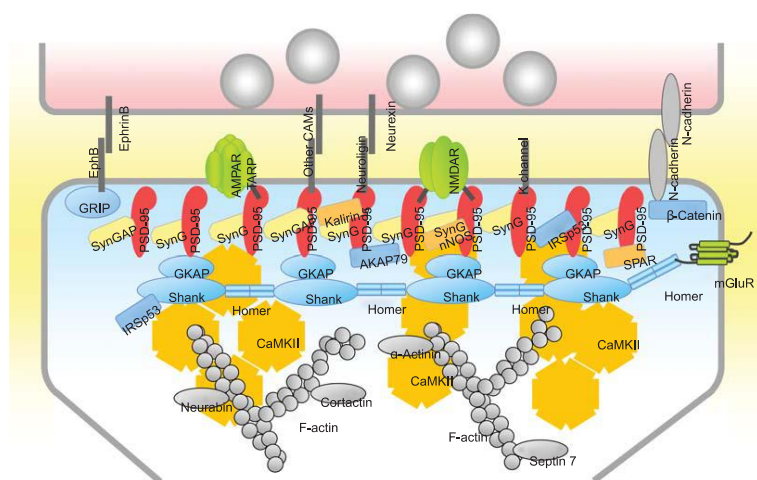
Az α -actinin az aktinszálak közötti keresztkötések kialakításában vesz részt, de szerepe van a dendrittüskék hosszúságának meghatározásában is. Az α -actinin a dendrittüskék

fejében kapcsolatot alakíthat ki az NMDA-receptorokkal is. Az aktinhoz kötődő α -actinin és tropomiozin mennyiségét a *drebrin* képes szabályozni.

Az aktinváz tehát egy időben és térben precízen szabályozott, folyamatosan épülő és bomló struktúra, amely biztosítja a dendrittüskék plaszticitásfüggő változásaihoz szükséges belső vázat.

3.1.3.3.3. A posztszinaptikus denzitás

Az elektronmikroszkópos felvételeken a serkentő szinapszisok posztszinaptikus régiójában, a plazmamembrántól 30-50 nm-re egy fehérjékben gazdag elektrondenz réteget figyelhetünk meg a citoplazmában. Innen ered a posztszinaptikus denzitás (PSD) elnevezés. A



szinaptikus transzmisszióban és a szinaptikus plaszticitásban résztvevő transzsinaptikus adhéziós molekulák, állvány- és adaptor fehérjék, ionotróp és metabotróp glutamát receptorok, ioncsatornák, foszfatázok, kinázok, GTP-kötő molekulák és proteázok találhatóak a PSD-ben (6.

6. ábra A posztszinaptikus denzitásban lokalizált fehérjék. (Sheng és Kim, 2011. alapján).

ábra; Li és Sheng, 2003). A PSD a preszinapszis aktív zónájával a transzsinaptikus adhéziós molekulákon keresztül létesít fizikai kapcsolatot (Feng és Zhang, 2009). A posztszinaptikus membránban lokalizált receptorok kihorgonyzását az aktin vázrendszerhez az állványfehérjék végzik. A PSD-ben az adaptor fehérjék az intracelluláris szignálok továbbításában játszanak szerepet.

A PSD kiterjedése függ a dendrittüskék típusától, általában a fonalas dendrittüskékben kisebb, a gomba morfológiájú dendrittüskékben nagyobb és perforált (Yuste, 2010). A PSD mérete jól korrelál a dendrittüskék fejének területével és a preszinaptikus vezikulák számával is (**1. ábra;** Nimchinsky és mtsai., 2002).

A posztszinaptikus denzitásban a legnagyobb mennyiségben a MAGUK (membrán-asszociált guanilát kináz) állványfehérje-család tagjai fordulnak elő. Három konzervált PDZ-domént (PDZ-1, PDZ-2, PDZ-3), egy SH3-domént (Src homológia 3), valamint egy enzimatikusan inaktív GK-domént (guanilát-kináz) tartalmazznak (Mizuno, 2013). A MAGUK

fehérjecsalád PSD-ben előforduló tagjai a PSD-95 (más terminológia szerint: SAP-90; szinapszis asszociált fehérje-90), a PSD-93, a SAP-97 és a SAP-102. A SAP-97 a PSD perifériáján foglal helyet és az AMPA-receptorok GluA1-es alegységéhez kapcsolódik, azok szállításáért és kihorgonyzásáért felelős (Anggono és Huganir, 2012).

A PSD-95 egy 95 kDa molekulásúlyú fehérje, amely a plazmamembrán alatt a PSD-ben hálózatot alkotva nagy mennyiségben megtalálható (Chen és mtsai., 2011). Az első és második PDZ-doménen keresztül kihorgonyozza az NMDA-receptorok GluN2-es alegységét, a harmadik PDZ-domén más neuronális membránfehérjével képes interakciót létesíteni (Kennedy, 2000).

A PSD-95 PDZ-doménjén keresztül interakciót alakíthat ki a SynGAP (szinaptikus Ras-GAP) fehérjével is (Kennedy és mtsai., 2005). A SynGAP nagy mennyiségben expresszálódik a dendrittüskékben. A SynGAP képes a kis GTPázok (Ras és Rap fehérjék) aktivitását növelni, ezzel elősegíti azok inaktivációját. A Ras és Rap fehérjék antagonisztikus módon működnek a dendrittüskékben. A Ras fehérjék az LTP kialakítása során játszanak fontos szerepet, a Rap fehérjék pedig az LTD alatt aktiválódnak (Kennedy és mtsai., 2005). A PSD-95 az enzimatikusan inaktív GK-doménjével kapcsolódhat a GKAP (guanilát kináz-asszociált fehérje) fehérjéhez is, amely így közvetett kapcsolatot biztosít a Homer/Shank állványfehérjecsaláddal is (Sheng és Kim, 2000).

A Homer/Shank fehérjéknek is változatos fehérjekötő doménjeik vannak, amelyekkel számos interakciót képesek kialakítani. A Homer nagy mennyiségben expresszálódik a központi idegrendszerben, mennyisége a szinaptikus aktivitással változik. A Homer családnak az emlősökben 3 tagja van: Homer-1, Homer-2 és Homer-3. Az alternatív splicing során további izoformák keletkezhetnek, ezek közül rövid és hosszú tagokat is megkülönböztethetünk (Shiraishi-Yamaguchi és Furuichi, 2007). A Homert a konzervált amino terminális domén, az EVH1 (Ena/VASP homológia 1) és a Homer-specifikus karboxi terminális domén építi fel. Más állványfehérjékhez és szignáltranszdukciós molekulákhoz az EVH1 doménjével kapcsolódik. Leggyakoribb kötőpartnereként a Shank említhető (Sheng és Kim, 2000). Asszociálódhat még a PSD perifériáján a metabotróp glutamát receptorokhoz, az I-es és III-as típusú IP₃-receptorokhoz (inozitol-trifoszfát), de az aktin vázrendszerrel is képes kapcsolatot kialakítani (Shiraishi-Yamaguchi és Furuichi, 2007).

A Shank állványfehérjének három alternatív splicing során keletkező tagját ismerjük: Shank-1, Shank-2, és Shank-3. Mindhárom Shank izoforma expresszálódik az agyban, de legnagyobb mennyiségben a Shank-1. A Shank fehérjék számos ankyrin ismétlődést, egy SH-3 domént, egy PDZ domént, egy prolinban gazdag régiót és egy SAM (steril alfa motívum

domén) domént tartalmaznak. A SAM doménjükkel önasszociációra is képesek, így más fehérjék számára óriási kötőfelületet hoznak létre a PSD-ben. A Shank és Homer fehérjék a dendrittüskék fejében egy állványszerű, rendezett struktúrát hoznak létre, amely akkor működik optimálisan, ha az alkotó fehérjék aránya 1:1 (Sheng és Kim, 2000; Hayashi és mtsai., 2009).

A CaMKII α sztöchiometriailag az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a dendrittüskékben, a PSD egyik fontos alkotója (Boeckers, 2006). A CaMKII α egy kalciumfüggő kináz, amely számos fehérjét (NMDA-receptorok, kalirin-7) képes foszforilálni. A kalirin-7 egy guanin-kicserélő faktor (GEF) molekula, amely képes a Rac GTP-ázok aktivitását növelni (Spiering és Hodgson, 2011).

A PSD-ben jelen vannak még olyan fehérjék is, amelyek a szinaptikus aktiváció hatására intracelluláris szignalizációs utakat hozhatnak működésbe. Ilyenek a Fyn tirozin kinázok, a PKA-k (protein kináz A) és a PKC-k (protein kináz C), valamint különböző foszfatázok is (Kennedy, 2000).

3.1.3.3.4. A posztzinaptikus glutamáterg receptorok

A glutamát receptorokat működésük szerint két nagy csoportra oszthatjuk. Az ionotróp glutamát receptorok ioncsatornaként is funkcionálnak, a metabotróp glutamát receptorok pedig G-fehérje kapcsolt szignáltranszdukciós utakat aktiválnak. Az ionotróp glutamát receptorok három típusát, az AMPA-, NMDA- és kainát típusú receptorokat különböztetjük meg (Traynelis és mtsai., 2010).

Az AMPA-receptor a glutamát kötődésére nem specifikus kation csatornaként nátriumionok és kalciumionok sejtbe áramlását és káliumionok sejtől kiáramlását biztosítja. Az AMPA-receptorok négy alegységből (GluA1-GluA4) épülnek fel. A hippocampusban a GluA1/GluA2 és a GluA2/GluA3-as heterotetramerek a legjellemzőbbek. Az AMPA-receptorok alegység-összetétele hatással van a receptorok szállítására és a szenzitizáció/deszzenzitizáció kinetikájára. Az AMPA-receptorok felszíni kihelyeződésük során először exocitózis útján a dendrittüskék extraszinaptikus membránjába jutnak, majd laterális diffúzióval épülnek be a szinapszisba. Az LTP során a sejtekbe áramló kalciumion aktiválja a CaMKII α -t, amely a GluA1-es alegységet foszforilálja a 831-es pozíciójú szerin oldalláncon, ennek következtében felgyorsul az AMPA-receptorok posztzinaptikus membránba rögzítése (Derkach és mtsai., 2007). A PSD-95 fehérje a stargazin fehérjén keresztül direkt kötődhet az AMPA-receptorokhoz, ezáltal felszíni kihelyeződésüket szabályozza. Az AMPA-receptorok szállításában még két PDZ-domén tartalmú fehérje, a GRIP (glutamát receptorkötő fehérje) és a PICK-1 (C-kináz-1-hez kapcsolódó fehérje) is részt vesz (Anggono és Huganir, 2012).

Az NMDA-receptorok nem specifikus kation csatornák, amelyeken nátrium, kalcium és káliumionok juthatnak át. A nyugalmi membránpotenciál értékén az NMDA-receptorok pórusában egy magnéziumion feszültségfüggő blokkot hoz létre. Ennek eltávolítását az AMPA-receptorok nyílásakor kialakuló depolarizáció biztosítja. Az NMDA-receptorok így koincidencia detektorként működnek, aktiválódásukhoz legalább két feltételnek kell teljesülnie: glutamátnek kell kötődnie a receptorhoz és a posztszinaptikus membránnak depolarizálódnia kell. Az NMDA-receptorok heterotetramer felépítésűek, amelyek két GluN1-es és két GluN2A-D alegységből épülnek fel. A GluN1-es alegységek a glicin kötésért, míg a GluN2A-D alegységek a glutamát kötésért felelősek. Ismert a GluN3-as alegység is, amely glicin kötésért felelős, de ennek szerepe kevésbé tisztázott (Paoletti és mtsai., 2013; Lee és mtsai., 2014).

A kainát receptorok nátriumionok és káliumionok számára átjárhatóak. Ezek a receptorok a központi idegrendszerben a pre- és posztszinaptikus membránokban is megtalálhatók. A gátló szinapszisokban, preszinaptikusan elhelyezkedő kainát receptorok a GABA felszabadulását képesek szabályozni. A posztszinaptikus sejtben az ingerre adott válasz időbeli lefutását/erősségét szabályozzák. A GluK2-es és GluK3-as kainát alegységekre génkiütött egerekben sérül a hosszú távú szinaptikus plaszticitás kiválthatósága (Contractor és mtsai., 2011).

A metabotróp glutamát receptorok G-fehérje kapcsolt intracelluláris útvonalakat szabályoznak, és többnyire posztszinaptikusan helyezkednek el. Ismert, hogy a metabotróp glutamát receptorok preszinaptikusan is előfordulhatnak, ahol a neurotranszmitterek felszabadításában játszanak szabályozó szerepet. Lokalizációjuktól függően az adenilát-cikláz enzim, illetve kálium és kalcium csatornák működését szabályozzák. A metabotróp glutamát receptorok a szinapszisok perifériáján lokalizáltak (Niswender és Conn, 2010).

3.1.3.3.5. A feszültségfüggő ioncsatornák

A feszültségfüggő kálium csatornák egy nagyon heterogén családot alkotnak. Fontos szerepet töltenek be az akciós potenciál alakjának, mintázatának kialakításában és a nyugalmi membránpotenciál szabályozásában is. A feszültségfüggő kálium csatornákról elmondható, hogy minden alegység első négy transzmembrán szegmentuma (S1-S4) részt vesz az ionpórus nyitódásának/záródásának szabályozásában. A csatornák gátlószereként ismert a 4-aminopiridin és a tetraetil-ammónium (Yellen, 2002). A kalcium aktivált kálium csatornák hat transzmembrán doménből épülnek fel, de rendelkeznek egy plusz transzmembrán doménnel is, amely a csatornák szenzitizációját szabályozza. Konduktanciájuk alapján két csoportra oszthatjuk fel őket (Voglis és Tavernarakis, 2006). Az alacsony konduktanciájú kalcium

aktivált kálium csatornák (SK) a neuronális excitabilitásban és a hiperpolarizáció modulálásában fontosak. A magas konduktanciájú kalcium aktivált kálium csatornák (BK) csak a preszinaptikus terminálisban találhatók (Humphries és Dart, 2015).

Az idegsejtekben általában az axon eredési dombon és a Ranvier-féle befűződésekben találhatók meg nagy sűrűségben a feszültségfüggő nátrium csatornák. Működésük elengedhetetlen az akciós potenciálok keletkezéséhez és az ingerület vezetéséhez. Az idegrendszerben a nátrium csatornák egy α -, egy β_1 - és egy β_2 -alegységből épülnek fel. Az α -alegység alakítja ki az ionpórust és ehhez az alegységhez kötődnek a csatorna különböző gátlószerei (tetrodotoxin (TTX) és saxitoxin). A közelmúltig tízféle α -alegységet (SCN1A-11A) és négyféle β -alegységet (SCN1B-4B) kódoló gént azonosítottak (Catterall és Swanson, 2015).

A dendrittüskékben lokalizált feszültségfüggő kalcium csatornák (voltage-gated calcium channel; VGCC) szinaptikus depolarizációra nyílnak. Ennek következtében a dendrittüskékben az intracelluláris kalcium szint akár a mikromoláris tartományig is megnövekedhet. A megemelkedett kalcium szint fontos szerepet játszik egyes enzimek (pl. CaMKII α és PKC) aktiválásában. A VGCC-k heteromultimer felépítésű komplexeket alkotnak, pórusformáló alegységük (Ca $_v\alpha$ 1) alapján több altípusukat (Ca $_v$ 1, Ca $_v$ 2 és Ca $_v$ 3) különböztetjük meg (Simms és Zamponi, 2014). A Ca $_v$ 1-es altípusú VGCC-ket közösen a neuronális L-típusú kalcium csatornáknak nevezik. Ezeknek a csatornáknak a specifikus gátlószere a nifedipin. A Ca $_v$ 2.1-es csatornákat a kisagyi Purkinje sejtekben és szemcsesejtekben írták le (P/Q-típusú VGCC-k). A Ca $_v$ 2.2-es csatornák (N-típusú VGCC-k) az egész központi idegrendszerben megtalálhatók. A P/Q- és N-típusú VGCC-k specifikus gátlószere az ω -conotoxin MVII C. A T-típusú VGCC-k a Ca $_v$ 3-as altípusba tartoznak, az agyban nagy mennyiségben expresszálódnak. A dendrittüskéken csak L-, P/Q- és T-típusú VGCC-k találhatók (Vogliss és Tavernarakis, 2006; Higley és Sabatini, 2012).

3.1.3.3.6. A proteasomális rendszer

A proteasomális fehérjebontó enzim kaszkád fontos szerepet tölt be a dendrittüskék fehérjekészletének szabályozásában. Alapállapotban a proteasomális rendszer tagjai a dendritekben lokalizáltak, de megfelelő külső stimulus hatására a komplex tagjai a dendrittüskébe szállítódnak. A dendrittüskékben zajló lokális fehérjeszintézis elengedhetetlen a proteasomális rendszer tagjainak összeszerelődéséhez/szintéziséhez (Tai és Schuman, 2008).

3.1.3.4. A dendrittüskék patológiás elváltozásai

Fiziológiás körülmények között a tüskedenzitás jól korrelál a kognitív funkciókkal, de patológiás körülmények között a dendrittüskék eloszlása, illetve ultrastruktúrája jelentősen megváltozhat. Az Alzheimer-kór, az autizmus, az alkoholizmus és alultápláltság a dendrittüskék minőségi és mennyiségi paramétereinek megváltozását okozhatja (Fiala és mtsai., 2002).

Az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyának *post-mortem* vizsgálata során nagy mennyiségben mutatható ki a kognitív és a nem-kognitív tünetekért felelős β -amiloid plakkok és hiperfoszforilált tau-fehérjék jelenléte. A sejtek számára toxikus β -amiloid gyengíti a szinaptikus transzmissziót és csökkenti a dendrittüskék számát (Tackenberg és mtsai., 2009). A szinaptikus résben felgyülemlett β -amiloid hatására csökken a felszíni NMDA- és AMPA-receptorok száma, ennek következtében a PSD morfológiája is jelentősen megváltozik (Knobloch és Mansuy, 2008). Nem teljesen tisztázott, hogy milyen útvonalakon, de közvetve az aktin vázrendszert is destabilizálja a β -amiloid. Az egyik lehetséges magyarázat szerint az emelkedett β -amiloid szint következményeképpen a cofilin aktivitása megnő, amely az aktin vázrendszer destabilizációját okozza. Ez a hatás számos neurodegeneratív betegségben kimutatható (Penzes és mtsai., 2011). A β -amiloid közvetve a tau-fehérje hiperfoszforilációjáért is felelős. A mechanizmus első lépése, hogy jelentősen képes a kalcineurin aktivitását fokozni. A kalcineurin egy kalciumérzékeny foszfataz, amely a posztszinapszisban csökkenti a szinaptikus transzmissziót, valamint képes aktiválni a GSK-3 β (glikogén szintáz kináz-3 β) fehérjét, amely a tau-fehérje foszforilációjáért felelős (Knobloch és Mansuy, 2008). A β -amiloid expozíciója során létrejött dendrittüske denzitás csökkenés kalcineurin gátlókkal megakadályozható (Wu és mtsai., 2010).

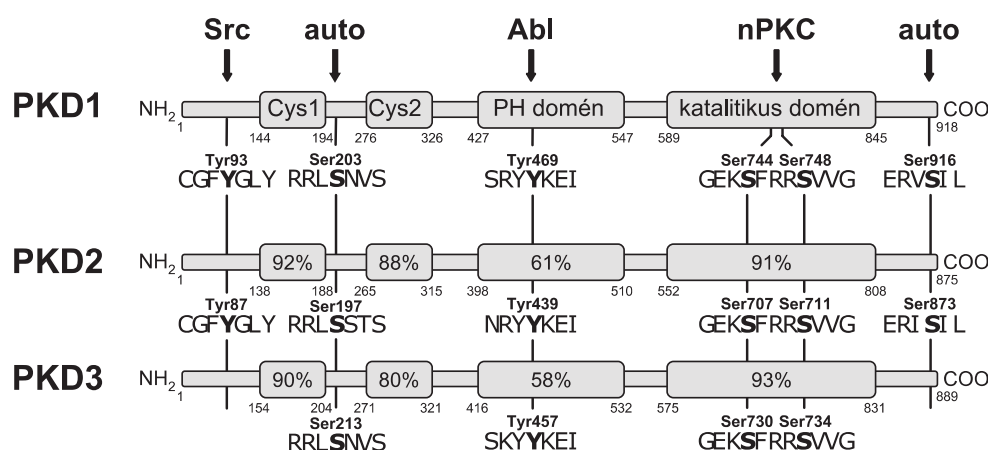
Egyes kórképek során (törékeny X-szindróma, hirtelen csecsemőhalál és autizmus spektrumzavar) a dendrittüskék száma jelentősen megnő (Fiala és mtsai., 2002). Az autizmus spektrumzavar több szindróma (Rett-szindróma, Asperger-szindróma és idiopátiás autizmus) összefoglaló elnevezése. A pácienseknél jellemző a dendrittüskék számának jelentős növekedése és a dendritágak hipertrofizációja (Penzes és mtsai., 2011). Az elváltozások hátterében genetikai polimorfizmusok állhatnak. A leggyakrabban a preszinapszisban előforduló neurexin-1 és a posztszinapszisban található neuroligin-3 és neuroligin-4-es génjében történő mutációk okozzák a fenti fenotípust. De olyan géntermékek érintettségét is leírták, mint a TSC-1 és TSC-2 (tuberous sclerosis fehérje), a PTEN (foszfataz és tensin homológ fehérje) és a Shank-3 (Südhof, 2008).

Nemcsak a dendrittüskék sűrűség-változásában nyilvánulhatnak meg eltérések. Jelentősen csökkenhet a dendrittüskék mérete (pl. Down-szindróma és skizofrénia során), torz (pl. alkoholistáknál és epilepsziás betegeknél) vagy ektópiás dendrittüskék is megjelenhetnek a sejttesten (pl. Menkes-szindrómában szenvedő betegeknél) (Fiala és mtsai., 2002).

3.2. A protein kináz D

3.2.1. A protein kináz D általános jellemzése

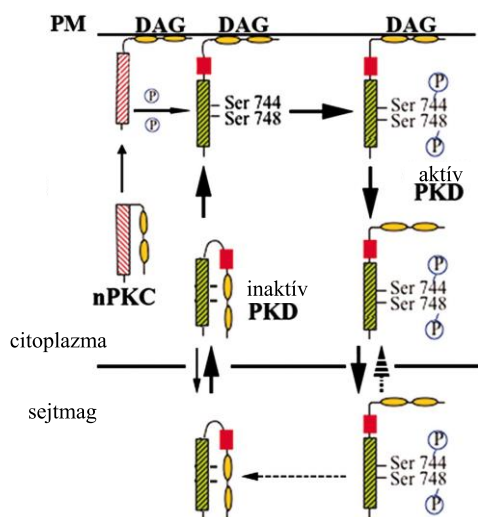
A protein kináz D-t először 1994-ben írták le (Valverde és mtsai., 1994; Johannes és mtsai., 1994), funkció szempontjából a szerin/treonin kinázok csoportjába tartozik. A PKD-t eredetileg az atipikus protein kináz C-k családjába sorolták (eredeti elnevezése ezért PKC μ), de ma már a katalitikus domének hasonlósága miatt a PKD-t a CaMK család tagjaként tartják számon. A PKD fehérje 3 izoformáját azonosították, a PKD1-et, valamint a PKD2-t és a PKD3 (PKC ν)-at (Sturany és mtsai., 2001; Hayashi és mtsai., 1999). A három izoforma hasonló felépítésű, de a PKD1 és PKD2 izoforma nagyobb szekvencia homológiát mutat egymással, mint a PKD3-mal (**7. ábra**): a PKD1 és PKD2 a karboxi terminális végén tartalmaz egy PDZ-domént és a regulátoros doménben egy hosszabb, hidrofób aminosavakban gazdag szekvenciát, de ezek a PKD3 esetében nem találhatók meg (Avkiran és mtsai., 2008; Rozengurt, 2011). A PKD jellegzetes szubsztrát szekvenciája: AALVRQMSVFFF (Nishikawa és mtsai., 1997), azaz a foszforilálható szerin oldallánchoz viszonyítva -3-as pozícióban bázikus aminosav (pl.: arginin), a -5-ös pozícióban pedig leucin vagy izoleucin helyezkedik el (Rozengurt és mtsai., 2005; Steinberg, 2012). Dolgozatomban részletesebben csak a PKD1-gyel foglalkozom, amelyet a továbbiakban PKD-nak nevezek.



7. ábra Egér PKD izoformáinak domén szerkezete és kitüntetett foszforilációs helyei. A domén szerkezetekben a százalékos értékek a PKD1-hez viszonyított szekvencia homológiát jelzik. (Avkiran és mtsai., 2008. alapján).

3.2.2. A protein kináz D szerkezete

A PKD domén szerkezete a fehérje sejten belüli lokalizációját és szabályozását is megszabja. A PKD enzim két doménből épül fel. Az amino terminális rész az enzim aktivitását



8. ábra A PKD transzlokációjának és aktiválódásának mechanizmusa. (Rozengurt és mtsai, 2005. alapján).

aktivációja szempontjából fontos lépés. A ciszteinben gazdag domén mellett helyezkedik el a pleckstrin homológia domén (PH domén). A PH domén a G $\beta\gamma$ G-fehérje alegységgel képes interakciót kialakítani, amely a vezikulák Golgi-készülékről való lefűződésében játszik fontos szerepet (Ghanekar és Lowe, 2005). Ennek teljes deléciója a PKD megnövekedett aktivitásához vezet (Iglesias és Rozengurt, 1998). A kináz aktivitásért a katalitikus domén felelős.

3.2.3. A protein kináz D aktiválódásának mechanizmusai

Nem idegsejtekben a PKD normál körülmények között nagyon alacsony katalitikus aktivitással rendelkezik, ennek oka a szabályozó régiók gátló hatása. A PKD alapállapotban a citoplazmában található, a fehérje kisebb hányada a sejtmagban, a mitokondriumnál, a plazmamembránál, illetve a Golgi-készüléknél lokalizált (**8. ábra**). A PKD aktiválódásának több különböző módja ismert (Steinberg, 2012). Ezek közül a legismertebb a foszfolipáz C (PLC) – DAG dependens útvonal (Rozengurt és mtsai., 2005; **9. ábra**). A számos külső stimulust fogadni képes G-fehérje receptorok, illetve más tirozin kináz receptorok aktiválják a PLC-t, amely a PIP₂-ből DAG-ot hasít. A DAG közvetlenül és közvetve is fontos szerepet tölt be a PKD aktiválásában. A PKD a DAG-kötésen keresztül a sejtmembránhoz vagy más endomembránokhoz kapcsolódik, ahol a PKC a 744-es és 748-es pozíciójű szerin oldalláncot (transz)foszforilálja (hurok foszforiláció). E két szerin

glutaminsavvá történő cseréje a foszforilált aminosavat mimikálja (konstitutívan aktív PKD; PKD^{S744/748E} vagy caPKD), alaninra történő elmutáltatása pedig meggátolja a PKD aktivitását (PKD^{S744/748A}) (Steinberg, 2012). A DAG a PKC különböző izoformáinak aktiválására is képes, amelyek a PKD teljes aktivációját segítik. Ha a PKD 612-es pozíciójű lizin aminosav maradéka helyett egy triptofánt kódol (PKD^{K612W}), a fehérje kináz funkciója sérül, azonban a szubsztrát, illetve a DAG-kötő képessége fennmarad. Az így kialakult PKD mutáns (ún. „kinase dead” vagy kdPKD) jelenléte az endogén PKD membránhoz való lokalizációját és aktivitását is gátolja, domináns-negatív hatású (Hausser és mtsai., 2002).

A PKD a sejteket ért oxidatív stressz során is aktiválódhat. Ebben a nem receptor tirozin kinázok (Src kináz és c-Abl kináz) és a PKCδ-k játszanak szerepet. A folyamat első lépéseként a Src kináz aktiválja a c-Abl kinázt és a PKCδ-t, majd foszforilálja a PKD 93-as pozíciójű tirozinjét. Az aktivált c-Abl kináz a PKD PH doménjén belül foszforilálja a 469-es pozíciójű tirozint, az aktivált PKCδ pedig a PKD-t 744-es és 748-as pozíciójű szerin oldalláncán, azaz az aktivációs hurkon képes foszforilálni. Az aktivált PKD az IKKα-IKKβ komplexen (I-κB kináz) keresztül elősegíti az NF-κB (nukleáris faktor-κB) sejtmagi transzlokációját. Ekkor az NF-κB növeli a ROS-ok (reaktív oxigén gyök) eliminálásában fontos szerepet játszó szuperoxid-dizmutáz expresszióját (Storz és mtsai., 2005; Döppler és Storz, 2007).

A PKD aktiválódásának egy másik alternatív módja a PH domén kaszpáz-3 általi hasítása, aminek hatására a PKD katalitikus doménje felszabadul a szabályozó régió gátlása alól (Endo és mtsai., 2000). A PKC-k a PKD-t még a 249-es pozíciójű szerin oldalláncan is képesek foszforilálni, de ez nem vezet a fehérje aktiválódásához (Vertommen és mtsai., 2000).

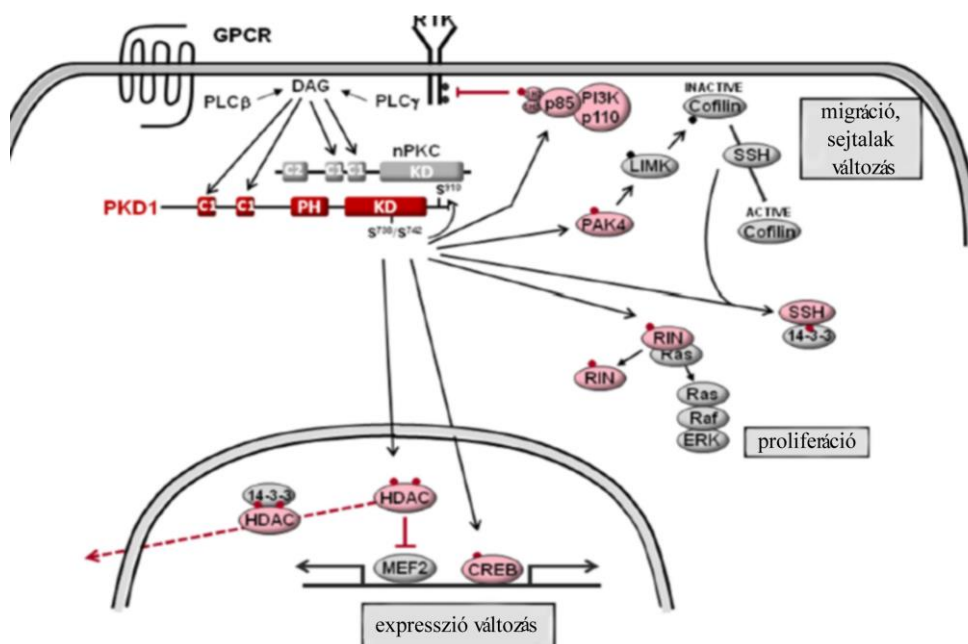
Az aktív PKD Cys2 doménjének segítségével képes a sejtmagba is bejutni, ahol számos gén átíródását képes szabályozni, a PKD nukleáris exportjához viszont a PH domén szükséges (Rey és mtsai., 2001). A PKD nemcsak szubsztrátok foszforilálását végzi, hanem a 205-ös és 916-os pozíciójű szerinjén auto- illetve transzfoszforilációra is képes. A 916-os pozíciójű szerin oldallánc foszforilációs állapota szorosan összefügg a PKD aktivitásával (Matthews és mtsai., 1999). Rybin és munkatársai megfigyelték, hogy a kináz inaktív PKD mutánsban a 916-os szerin oldallánc foszforilált állapotban volt. Ugyanakkor, ha a 916-os pozíciójű szerint alaninra cserélték, a PKD erőteljes kináz aktivitást mutatott (Rybin és mtsai., 2009). Ez továbbra sem tisztázott teljesen, de feltételezhető, hogy a 916-os szerin foszforilációja segíti az enzim aktivitását. A foszforilált 205-ös és 916-es pozíciójű szerin oldalláncok a PKD 14-3-3, illetve PDZ-domén tartalmú fehérjékhez való kötődését biztosítja, amely a PKD működéséhez elengedhetetlen (Sánchez-Ruiloba és mtsai., 2006).

3.2.4. A protein kináz D sejtelettani funkciói

A PKD számos alapvető fontosságú sejtelettani folyamatban játszik szerepet. Szerteágazó hatásai között a géntranszkripció szabályozásában, az intracelluláris szignalizációs utak modulálásában, az aktin váz átrendeződésében, a membrán traffickingben játszott szerepe jól ismert. Nem megfelelő működése során patológiás folyamatokat is elindíthat (Rozengurt, 2011; Steinberg, 2012). Ezek közül a legintenzívebben kutatott terület a PKD és a tumorképzés kapcsolata (Sundram és mtsai., 2011).

3.2.4.1. A PKD géntranszkripció befolyásoló hatása

A PKD a II-es típusú hiszton deacetilázok (HDAC-5 és HDAC-7) foszforilációján keresztül képes szabályozni a génexpressziót (**9. ábra**). Patkány szívizomsejt tenyészetekben, endothelin-1 kezelést követően a PKD aktiválódik és a sejtmagban a HDAC-5-öt foszforilálja. A foszforiláció hatására az HDAC-5 a 14-3-3 fehérjéhez kapcsolódik, és a komplex elhagyja a sejtmagot. Ennek hatására a sejtmagban a MEF-2 (miocita növelő faktor) transzkripciós faktor felszabadul a gátlás alól és olyan gének átírását indítja be, amelyek a szívizom-összehúzódás szabályozásáért felelősek. Ennek nem megfelelő szabályozása szívizom hipertrófiához vezethet (Bossuyt és mtsai., 2011). Hasonló mechanizmus mentén a PKD a HDAC-7 működését is képes szabályozni, amely a csontszövet fejlődésében szerepet játszó Runx-2 transzkripciós faktor működését befolyásolja (Jensen és mtsai., 2009).



9. ábra A PKD aktiválódásának lehetséges mechanizmusai és az általa szabályozott molekuláris útvonalak. A rózsaszínnel jelzett fehérjék a PKD közvetlen szubsztrátjai. A nyilak a főbb szabályozási útvonalakat jelzik. (Steinberg, 2012. alapján).

3.2.4.2. A PKD által szabályozott jelátvitel és a sejtprolifерációra gyakorolt hatása

Az intracelluláris szignalizációs utak modulálásának és a sejtek proliferatív képességének szabályozásában a PKD fontos szereplő **(9. ábra)**. A PKD ezt a hatást a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalak szabályozásán keresztül valósítja meg (Wang, 2006). A PKD egyik ismert célpontja a RIN1 (Ras és Rab interaktor fehérje 1). Az aktív PKD foszforilálja a RIN1-et, amelyhez foszforilált állapotban 14-3-3 fehérjék kötődnek, így megakadályozzák a RIN1-Ras interakciót. Ennek következtében a Ras fehérjék aktiválják a Ras-Raf-MEK-ERK1/2-es⁴ jelátviteli útvonalat (Wang és mtsai., 2002). Ezzel ellentétesen, a PKD a c-Jun foszforilálásán keresztül a c-Jun-JNK-MKK-MEKK⁵ szignalizációs útvonalat gátolja (Hurd és mtsai., 2002).

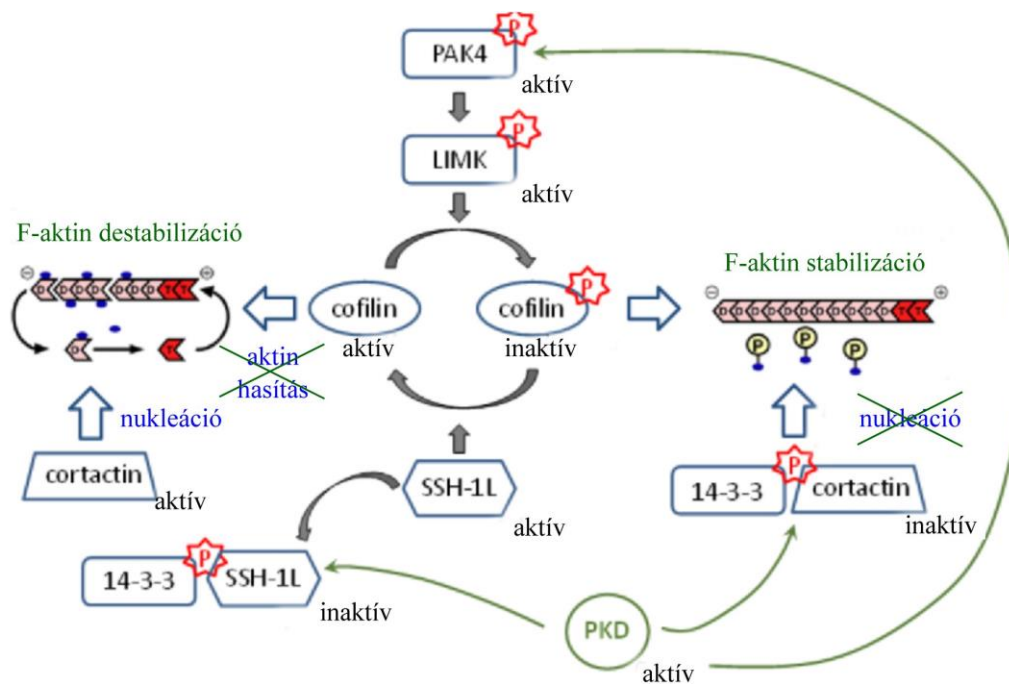
3.2.4.3. A PKD hatása a sejtmozgásra

Az aktin vázrendszer átrendeződésének szabályozásában több intracelluláris szignalizációs kaszkád is érintett. Ezek közül az egyik legjobban tanulmányozott a cofilin dependens útvonal, amelynek modulálásában a PKD is fontos szerepet játszik **(10. ábra)** (Olayioye és mtsai., 2013). A PKD közvetlenül is tudja foszforilálni a PAK4-et (p21 aktivált kináz 4) a 474-es szerin oldalláncán. Ez a lépés a LIMK1/2-ön keresztül a cofilin foszforilációjához (inaktiválásához) vezet. A cofilin aktivitás gátlása összességében az aktin filamentumok stabilizálódásához vezet.

A PKD ebben a szabályozási láncban közvetve nemcsak a cofilin foszforilációjáért felelős, hanem a SSH 978. pozíciójú szerin oldalláncának foszforilációjáért is. A foszforilált SSH a citoplazmában a 14-3-3 fehérjéhez kötődik ki, amely az SSH aktivitásának elvesztéséhez vezet **(10. ábra)** (Spratley és mtsai., 2011). A PKD a cortactin foszforilációján keresztül az aktin nukleáció gátlásáért is felelős **(10. ábra)** (Eiseler és mtsai., 2010).

⁴ A Ras – Raf - mitogén aktivált fehérje kináz/ERK kináz – extracelluláris szignál kapcsolt kináz1/2-es szignalizációs útvonal a sejtek proliferatív képességét növeli.

⁵A c-Jun - c-Jun N-terminális kináz – mitogén aktivált fehérje kináz kináz – mitogén ERK kináz kináz jelátviteli útvonal gátlása a sejtek osztódási potenciálját csökkenti.



10. ábra A PKD három jelátviteli útvonalon keresztül közvetve képes szabályozni az aktin filamentumok turnover-t. (Mizuno, 2013. alapján).

A PKD az aktin vázrendszer működését a cofilintól független útvonalakon keresztül is tudja szabályozni. A RIN1 292-es szerin oldalláncának PKD általi foszforilációja a c-Abl kináz aktivációjához vezet, amelynek eredményeképpen az epitheliális sejtek migrációs képessége romlik (Ziegler és mtsai., 2011).

A PKD nem csak az aktin vázrendszer átrendeződésén keresztül képes szabályozni a sejtek migrációs képességét, hanem az E-cadherin dependens útvonalakon is (Olayioye és mtsai., 2013). Az E-cadherin expressziójának egyik fő szabályozója a Snail transzkripciós faktor. A PKD két útvonalon keresztül is képes az E-cadherin aktivitását növelni. Egyfelől képes közvetlenül foszforilálni az E-cadherint, másfelől pedig a Snail foszforilálásán keresztül képes meggátolni, hogy a Snail gátló hatást fejtsen ki az E-cadherinre (Jaggi és mtsai., 2005). A foszforilált E-cadherin csökkenti a sejtek migrációs képességét és növeli a sejtek aggregációs képességét.

3.2.4.4. A PKD aktivitás és a membránkörforgás irányítása közötti kapcsolat

A PKD bizonyítottan szerepet játszik a vezikulák Golgi-komplexről való lefűződésében és a plazmamembránba irányuló fehérje- és lipidtranszportban is (Liljedahl és mtsai., 2001). A PKD képes foszforilálni a PI4KIII β -t (foszfatidil-inozitol-4-kináz-III-béta), ezzel növelve az enzim lipid kináz aktivitását, amely következtében nagy mennyiségben keletkezik PI4P (foszfatidil-inozitol-4-foszfát) (Hausser és mtsai., 2005). A PI4P a transz-Golgi

hálózat (TGN) membránjában a lipidek szállítását végző fehérjék (CERT; ceramid szállító fehérje és OSBP; oxisztatol-kötő fehérje) számára egy dokkoló pontot hoz létre. A CERT és OSBP a koleszterin és ceramid szállítását végzi, amelyből a szfingomielin-szintáz enzim szfingomielint és DAG-ot hoz létre. A keletkezett DAG pozitív visszacsatolás révén a PKD aktivitásának további növekedését eredményezi. Ezen felül a DAG a Golgi-készülék membránjában betüremkedések képződését váltja ki, ez pedig a vezikulák Golgi-készülekről való lefűződését segíti elő. A PKD közvetlenül is képes az OSBP és CERT foszforilálására, amely gátolja a koleszterin és szfingomielin toxikus mennyiségben való felhalmozódását (Fugmann és mtsai., 2007; Nhek és mtsai., 2010).

3.2.4.5. A PKD aktivitás szerepe idegsejtekben

A PKD mindhárom izoformája a központi idegrendszerben már az embrionális kortól kezdve nagy mennyiségben expresszálódik, de a fehérje idegsejtekben betöltött funkciójáról ismereteink még hiányosak (Oster és mtsai., 2006; Ellwanger és Hausser, 2013; Li és Wang, 2014). A PKD elsőként azonosított neuronális szubsztrátja a Kidins220 (kináz D-interaktor szubsztrát fehérje 220 kDa). Ennek az integráns membránfehérjének az expresszióját az agyban és neuroendokrin sejtekben figyelték meg (Iglesias és mtsai., 2000). A Kidins220 részt vesz a korai szinapszis formáció kialakításában, ehhez a fejlődő szinapszis területére kinezin molekulákkal asszociálva a szállítmány transzportját segíti elő (Cortés és mtsai., 2007).

A PKD fontos szerepet tölt be az agyi érkatasztrófák során felszabaduló reaktív oxigén gyökök eliminálásában. A PKD két ismert célmolekulájának (nNOS (neuronális nitrogén-monoxid szintáz és Hsp27 (hőshock fehérje 27)) foszforilálásán keresztül neuroprotektív hatást fejthet ki (Sánchez-Ruiloba és mtsai., 2014; Döppler és mtsai., 2007).

A PKD fontos szerepet tölt be az idegsejtekben zajló membránfehérje-transzport irányításában. Képes szabályozni a közepagyi striatális dopaminoceptív neuronokban a dopamin receptorok felszíni kihelyeződését. Kokain kezelés mellett, a PKD aktivációjának következtében a dopamin receptorok mennyisége megnő és egy jellegzetes túlmozgásos kórkép megjelenését figyelhetjük meg (Wang és mtsai., 2014). További bizonyíték, hogy a PKD kináz inaktív formájának túltermeltetése során az alapvetően dendritikus eloszlású transzferrin receptor az axonban is megjelenik (Bisbal és mtsai., 2008).

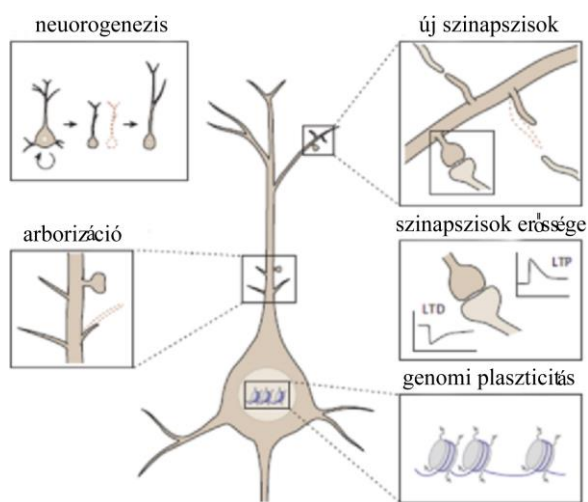
A PKD idegsejtekben betöltött szerepét támasztja alá, hogy a fehérje kináz inaktív formájának expressziója csökkenti a dendritfa arborizációját, a dendritek kiterjedését és a Golgi-készülék fragmentálódásához vezet (Horton és mtsai., 2005; Czöndör és mtsai., 2009). A PKD a dendritekbe kihelyezett Golgi-készülék (Golgi-outpost) formálásában is szerepet

játszik. A konstitutívan aktív PKD működésének következtében megnövekszik a primer dendritekben a Golgi-outpostok és Golgi-készülékből lefűződő tubulusok mennyisége (Quassollo és mtsai., 2015).

A PKD neuronális plaszticitásban betöltött szerepéről kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A HDAC foszforilációján keresztül a MEF2C transzkripciós faktort közvetve képes szabályozni. Ennek a hippocampusz-dependens térbeli tanulás és memória kialakulásában van fontos szerepe (Barbosa és mtsai., 2008; Pandey és mtsai., 2015). A PKD ismert neuronális szubsztátja még a RIN1 fehérje. Ez többnyire a dendritekben és a dendrittüskékben lokalizálódik, ahol az LTP szabályozásában is részt vesz és aktivitása egyes viselkedési mintázatok (pl. averzív memória) kialakulását is befolyásolja (Bliss és mtsai., 2010).

3.3. A neuronális plaszticitás

William James, amerikai pszichológus az 1800-as évek végén megjelent „Principles of psychology” című könyvében használta először a plaszticitás kifejezést. James elméleti síkon próbált meg magyarázatot adni arra, hogy miért változhatnak meg alapvető szokásaink az



11. ábra A neuronális plaszticitás különböző szinteken befolyásolja az idegsejtek fiziológiai működését. (Castrén és Hen, 2013. alapján).

életünk során (Berlucchi és Buchtel, 2009). A neuronális plaszticitás egy összefoglaló elnevezés, amely magában foglalja a külső vagy belső ingerek hatására az idegrendszerben bekövetkező adaptív válaszokat, az idegsejtek strukturális/morfológiai és funkcionális változását is. A formálhatóságra való képességet az idegsejtek keletkezésüktől elpusztulásukig megtartják, amelyeket belső és külső faktorok befolyásolnak. A neuronokban a plasztikus folyamatok

különböző szinteken jelennek meg (**11. ábra**) (Castrén és Hen, 2013). A neuronális plaszticitás sejtszintű mechanizmusainak károsodása különböző pszichátriai kórképek megjelenéséhez vezethet (Baroncelli és mtsai., 2011).

3.3.1. Új szinapszisok keletkezése

A neuronoknak a funkcionális működésükhöz nyúlványokat kell növeszteniük és szinapszisokat kell kialakítaniuk. A szinapszis a preszinaptikus és posztszinaptikus partner közötti folyamatos kommunikáció eredményeképpen jön létre. A szinapszisok és a dendrittüskék száma és szerkezete életünk során folyamatosan változik. Ezekről a folyamatokról a Bevezetésben részletesebben szó esik.

3.3.2. A szinaptikus plaszticitás

A szinaptikus plaszticitás alatt a szinapszist alkotó pre- és posztszinaptikus partnerek közötti kapcsolatok erősségének változását értjük. A szinapszisok plaszticitása néhány milliszekundumtól akár órákig is tarthat. A szinaptikus plaszticitásnak már számos formáját leírták. Ezek között említhető a rövid és hosszú távú szinaptikus plaszticitás és a homeosztatiszikus plaszticitáshoz sorolt szinaptikus (homeosztatiszikus) scaling (Citri és Malenka, 2008).

3.3.2.1. A rövid távú szinaptikus plaszticitás

A rövid távú szinaptikus plaszticitás néhány száz milliszekundumtól másodpercekig tartó folyamat. A központi idegrendszerben facilitációról akkor beszélünk, ha a preszinaptikus sejtet ingerelve a posztszinaptikus sejtben mérhető posztszinaptikus potenciálok amplitúdója növekszik. A rövid távú szinaptikus plaszticitás másik formája a depresszió, amely során az ismételt ingerlések következtében az ingerületátvitel hatékonysága csökken (Blitz és mtsai., 2004).

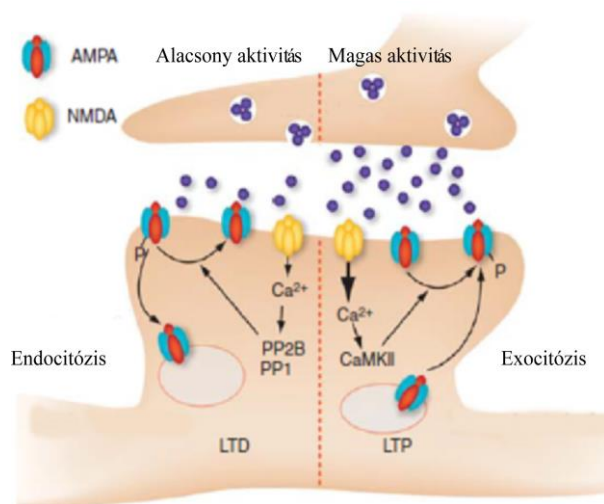
3.3.2.2. A hosszú távú szinaptikus plaszticitás

A szinaptikus kapcsolatok erősségének változása a tanulás folyamatának egyik elengedhetetlen lépése. Ennek elméleti magyarázatát Donald O. Hebb adta meg. A Hebb-féle szinapszis modelljének alapja: „Ha egy A sejt axonja elég közel van ahhoz, hogy egy B sejtet serkentsen, és ismételten vagy következetesen részt vesz B sejt kisütésében, akkor valamilyen növekedési folyamat vagy metabolikus változások következtében a jövőben A sejt hatékonyabban fogja kisütni a B sejtet.” (Hebb, 1949). Hebb posztulátuma a mai napig érvényes és a memóriarögzítés folyamatának egyik legelfogadottabb modellje.

A tanulás folyamatának sejt szintű mechanizmusát először Bliss és Lømo írta le. Altatott nyúl hippokampuszában rövid ideig tartó nagy frekvenciás (100 Hz) sorozatingerléssel sikerült hosszútávú szinaptikus hatékonyság-növekedést (azaz LTP-t) előidézni (Bliss és Lømo, 1973). Bliss és Lømo kísérleteiben az ingerek egy bemenetre érkeznek, ebben az esetben csakis az időbeliség a korlátozó az LTP kialakulásához (homoszinaptikus tanulás/LTP). A

heteroszínaptikus LTP kialakulásához az idegsejtek kooperációjának, asszociációjának, tér- és időbeli kapcsoltságának is egyszerre kell teljesülnie. A kooperáció azt jelenti, hogy a bemenetet biztosító rostoknak egyszerre kell aktiválódniuk. Az asszociatív működés során az eltérő erősségű ingerek társítása történik, vagyis ha egy gyenge ingert kapcsolunk egy erős ingerhez, akkor később a gyenge ingerre is erősebb választ kell, hogy kapjunk. A tér- és időbeli kapcsoltság pedig azt jelenti, hogy a bemenetre érkező válaszok kritikus időtartományon és területen belül alakuljanak ki (Lynch, 2004). Az LTP egyik legjobban tanulmányozott formája az asszociatív, NMDA-receptor függő LTP, amely heteroszínaptikus változásokat indukál (Lüscher és Malenka, 2012).

Az NMDA-receptor-függő LTP kialakulásában az AMPA- és NMDA-receptoroknak fontos szerepe van (**12. ábra**). A preszínaptikus sejtől felszabaduló glutamát a posztszínaptikus sejtben az AMPA-receptorok nyitását váltja ki, a beáramló nátriumionok így hipopolarizációt idéznek elő. -35 mV körüli membránpotenciál értéken az NMDA-receptorok



12. ábra Az LTD és LTP kialakulásának sematikus ábrázolása. (Lüscher és Malenka, 2012. alapján).

pórusából a magnéziumionok felszabadulnak, így glutamát kötés mellett az ioncsatorna kinyílik és nátriumionok, káliumionok és kalciumionok áramlanak a dendrittüskék fejébe. Az erőteljes depolarizáció hatására a posztszínaptikus membránba VGCC-k épülnek be, amelyek további kalciumionok bejutását biztosítják. Az intracelluláris kalciumion szint emelkedése különböző kalciumfüggő szignalizációs kaszkádokat aktivál. Az LTP kialakulásában a

CaMKII α az egyik legfontosabb kalciumfüggő szabályozó molekula. Aktivációja elősegíti az AMPA-receptorok membránba rögzítését, emellett növeli azok konduktanciáját is. A CaMKII α által irányított jelátviteli útvonalak közvetve számos transzkripciós faktor aktiválódását segítik elő. Ez új fehérjék (pl. BDNF; agyi eredetű növekedési faktor, Arc) szintézisét biztosítja (Ebert és Greenberg, 2013). Ez a folyamat a szinapszis fennmaradásához és megerősödéséhez nélkülözhetetlen (Lüscher és Malenka, 2012; Citri és Malenka, 2008). A dendrittüskébe jutott kalciumionok különböző PKC-k aktivitását is növelik, ami retrográd hírvivők (nitrogén-monoxid, arachidonsav és származékai) felszabadulását váltja ki a posztszínaptikus sejtől, melyek a preszínaptikus sejt transzmitter leadását fokozzák (Regehr és mtsai., 2009).

Az LTP-vel ellentétes folyamat a tartós szinaptikus hatékonyság csökkenés, azaz az LTD. LTD következik be, ha alacsony frekvenciával történő ismételt ingerlés (1-5 Hz) éri a posztzinaptikus sejtet a hippocampusban. Agyterületenként az ingerlés specifikus frekvenciája más-más elektrofiziológiai válaszokat produkál. LTD során az intracelluláris kalciumion szint emelkedése kisebb lesz a dendrittüskékben (a kialakult depolarizáció nem elegendő ahhoz, hogy az NMDA-receptorok is nyitódjanak), ami különböző foszfatázokat (PP1 és PP2B) aktivál **(12. ábra)**. Ennek következtében a PKA-k és PKC-k defoszforilálódnak, így az endocitózis fokozódása mellett az AMPA-receptorok kisebb hányada reciklizálódik. Emellett a dendrittüskék citoszeletális vázrendszerében is változások történnek. A tüskék morfológiája megváltozik, térfogatuk kisebb lesz (Lüscher és Malenka, 2012).

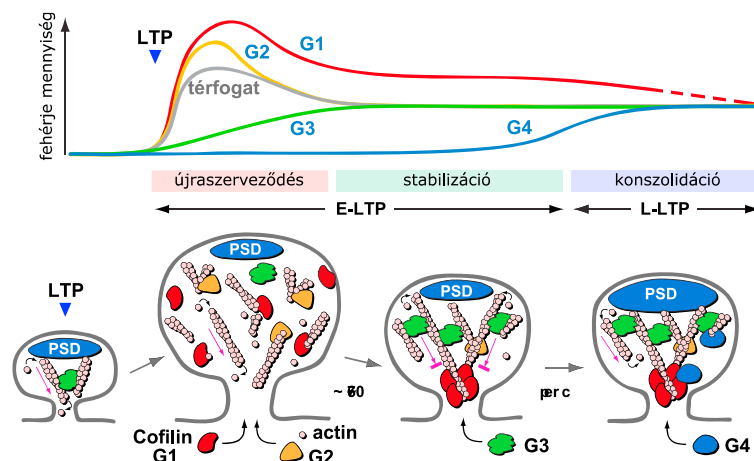
Az LTP-t az idő függvényében két szakaszra lehet osztani. A korai LTP alatt (E-LTP), amely néhány perc alatt játszódik le, új fehérjék szintézise nem történik, hanem a sejtbe jutott kalciumionok indítanak be számos intracelluláris szignalizációs utat. A késői LTP (L-LTP) alatt a szinapszisok számának és erősségének megváltozásához a sejtek fehérjékészletének módosulása is szükséges, amely órákat vesz igénybe (Pang és Lu, 2004).

Az LTP különböző fázisai alatt a dendrittüskék főbb molekuláris komponenseinek mennyisége és eloszlása jellegzetesen megváltozik, ami a dendrittüskék morfológiáját is befolyásolja. Az LTP alatt lezajló strukturális változásokat Bosch és munkatársai hipotézisén keresztül mutatom be **(13. ábra)** (Bosch és mtsai., 2014). Az LTP során bekövetkező eseményeket három részre oszthatjuk (újraszerveződés, stabilizáció és konszolidáció).

A folyamatban résztvevő fehérjéket mennyiségi változásuk időrendje alapján négy kategóriába sorolhatjuk. A G1-es csoportba pl. a cofilint, a G2-es csoportba az aktint és az Arp2/3 komplexet, a G3-as csoportba a CaMKII α -t és a profilint, végül a G4-es csoportba a PSD-t alkotó fehérjéket, így a Homer1b-t és a PSD-95-t soroljuk.

Az újraszerveződés fázisa alatt (1-7 perc) a G1 és G2 csoportba tartozó fehérjék mennyisége emelkedik. A folyamatban a cofilin kulcsszerepet tölt be: a filamentáris aktin hasításán keresztül számos új plusz véget generál, ezáltal lehetőséget biztosít az aktin polimerizációjára. Ez az LTP indukciója után már 20 másodperccel megtörténik. Az Arp2/3 komplex is segíti ezt a folyamatot, mivel új elágazásokat hoz létre, így a dendrittüskék feje átmenetileg kiszélesedik. A stabilizáció folyamata alatt a cofilin csak a dendrittüskék nyakában lesz aktív, ahol az F-aktin mínusz végek találhatók. A dendrittüskék fejében a cofilin foszforilált (inaktív) formában van jelen. Ezzel ellentétesen a polimerizációt segítő fehérjék (profilin) mennyisége nő (G3 csoport). A konszolidáció során megnövekszik a G4 csoportba sorolt Homer1b és PSD-95 szintje, amelyek a PSD térfogati növekedését biztosítják. Ez lehetőséget

teremt a szinapszis megerősödéséhez, mert a növekvő PSD több glutamáterg receptort és feszültségfüggő ionszűrőt képes kihorgonyozni. A konszolidáció fázisában már új fehérjék szintézisére is szükség van, ezek a lépések az L-LTP-hez sorolható.



13. ábra A dendrittűskék morfológiájának és molekuláris komponenseinek a változása LTP alatt. (Bosch és mtsai., 2014. alapján).

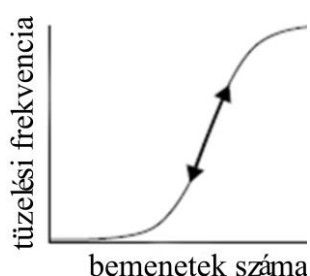
A hippocampális idegsejttenyészetek esetén számos módszer létezik, amelyekkel LTP-t válthatunk ki. A klasszikus nagy frekvenciájú, repetitív, preszinaptikus stimuláció (high frequency stimulation; HFS) mellett kémiai úton is kiváltható LTP (Molnár, 2011). Forskolin és rolipram kezelés hatására mind a pre-, mind a posztzinaptikus partnerben megtörténik a PKA aktivációja, amely az LTP kialakulását segíti elő. A glicinnel kiváltott kémiai LTP (GI-LTP) során specifikusan az NMDA-receptorok aktivációja következik be. A GI-LTP esetében elengedhetetlen a pre-kondicionálás, ami azt jelenti, hogy a tenyészetben a hálózati aktivitást meg kell gátolni. A GI-LTP hatására az NMDA-receptorok aktiválódása és a túskefejek kiszélesedése figyelhető meg. Ennek háttérében a sejtekbe jutó kalcium által aktivált CaMKII α foszforilációja áll. Ez a lépés számos intracelluláris jelátviteli útvonalat szabályoz (Park és mtsai., 2006; Oh és Derkach, 2005).

Hosszútávú szinaptikus hatékonyság csökkenést (LTD) válthatunk ki alacsony frekvenciájú, repetitív sorozatingerléssel (low frequency stimulation; LFS) hippocampális agysejtelekben vagy akár tenyésztett hippocampális idegsejtekben is. Az alkalmazott frekvenciasáv LFS protokoll esetén 1-5 Hz. Emellett számos protokoll létezik még, amely során kémiai anyagadással válthatunk ki LTD-t (cLTD). Azokat az anyagokat, amelyekkel cLTD-t válthatunk ki, az alapján kategorizálhatjuk, hogy mely posztzinaptikus receptor működését modulálva okoz LTD-t. A DHPG (dihidroxifenilglicin) a metabotróp glutamát receptorok agonistája és alkalmazásával LTD-t generálhatunk. Érdekes megfigyelés, hogy NMDA-val

szintén LTD-t válthatunk ki. A folyamat molekuláris alapja, hogy NMDA kezelés hatására szerin/treonin foszfatázok (fehérje foszfatáz 1 (PP1), fehérje foszfatáz 2 B (PP2B)) aktiválódnak. Ennek következtében defoszforilálódnak az AMPA-receptorok GluA1-es alegységei, amelyek ezután internalizálódnak. A foszfatázok a PSD-95 295-ös pozíciójú szerin oldalláncát is képesek defoszforilálni, ennek eredményeképpen a PSD-95 kilép a PSD-ből. Ez a folyamat az AMPA-receptorok további endocitózist segíti elő (Collingridge és mtsai., 2010).

3.3.2.3. A homeosztatikus plaszticitás

A folyamatosan változó külső környezetben az idegsejtek a saját homeosztatikus állapotukhoz igazítják a válaszkészségüket úgy, hogy az számukra celluláris és hálózati



14. ábra

A homeosztatikus plaszticitás során a sejtre érkező bemenetek intenzitásától függően változik a tüzelési frekvencia. (Turrigiano és Nelson., 2000. alapján).

stabilitást biztosítson. Ezt a folyamatot homeosztatikus plaszticitásnak nevezzük (Turrigiano és mtsai., 1998). A homeosztatikus plaszticitás során nem csak a sejtek tüzelési frekvenciája változik meg, hanem tartós strukturális/morfológiai átalakulások is végbemennek a sejteken (Grubb és Burrone, 2010; Bencsik és mtsai., 2015). A mechanizmus háttere még nem teljesen tisztázott, de a folyamatban az L- és T-típusú VGCC-k is részt vesznek (Grubb és Burrone, 2010). A homeosztatikus változások alatt a sejtek globálisan finomhangolják szinapszisaik erősségét, míg a klasszikus Hebb-féle szinapszisban ez

szelektíven, egyedi dendrittűskékre vonatkozólag történik meg. A szinaptikus scaling a homeosztatikus plaszticitás egyik mechanizmusa, amely során az idegsejtekre érkező bemenetek intenzitásától (számától) függően a neuronok csökkentik vagy növelik a tüzelési frekvenciájukat (serkenthetőségüket) (14. ábra). A mechanizmus során az idegsejtek negatív visszacsatolással képesek szabályozni a saját válaszkészségüket. A homeosztatikus plaszticitás során jellegzetes elektrofiziológiai változásokat tapasztalhatunk a miniatűr serkentő posztzinaptikus áramok (mEPSCs vagy minik) amplitúdójában (Turrigiano és mtsai., 1998).

A szinaptikus scaling két típusát különböztetjük meg (homeosztatikus up- és downreguláció). Homeosztatikus upreguláció alakulhat ki, ha a hálózati aktivitás tartósan gátolt, amit KCl vagy tetrodotoxin kezeléssel lehet biztosítani. A megemelt extracelluláris káliumion koncentráció az idegsejtek membránját depolarizálja (depolarizációs blokk), ami a feszültségfüggő nátrium csatornák inaktiválódásával a hálózati aktivitást is gátolja. Grubb és munkatársai részletes vizsgálatokkal kimutatták, hogy a depolarizációs blokk jellegzetes morfológiai változásokkal is jár, mivel az axon iniciális szegmentum (AIS) disztális irányba

eltolódik (Grubb és Burrone, 2010; Evans és mtsai., 2013). A tartós TTX kezelés során a sejt felszíni AMPA-receptorok száma megnő és a sejtek a posztszinaptikus membrán felszínének növelésével reagálnak (Turrigiano és Nelson., 2000).

Homeosztatikus downregulációról akkor beszélünk, ha hálózati szinten a túlserkentettség állapota áll fenn, ekkor a sejtek ezzel ellentétesen ható kompenzáló folyamatokkal válaszolnak. Például tenyésztett idegsejtek tartós (minimálisan 48 órás) bikukullin kezelésére⁶ a PSD méretének csökkenését és a Shank fehérje mennyiségének csökkenését figyelték meg, ahol a Shank degradációjáért a proteasomális rendszer volt felelős (Ehlers, 2003).

3.3.3. Viselkedés-élettani tesztek/módszerek a neurobiológiában

A neurobiológiában gyakran alkalmazott viselkedés-élettani vizsgálatok kiválasztásakor fontos, hogy az alábbi kritériumoknak a tesztek és azok kivitelezése megfeleljen. A *megbízhatóság* (reliabilitás) kritériumok azt a célt szolgálják, hogy a teszt többszöri megismétlése esetén is azonos eredmények adódjanak. Az *érvényesítés* (validálás) kritériumokat további megfeleltetési csoportokra lehet osztani. A *tartalmi validálás* arra szorítkozik, hogy csak a mérendő paramétert számszerűsítsük, minimalizálva a külső zajokat. A *prediktív validálás* lényege, hogy a már ismert adatokból következtetni lehessen eddig még ismeretlen, de általános törvényszerűségekre. Az állatkísérletek során a prediktív validálás lényege, hogy az állatoknál megfigyelt/megmért paraméterek kiterjeszthetők-e emberi mérésekre is. Az *érzékenység* (szenzitivitás) kritériumok a minél pontosabb, adekvátabb mérések beállítását célozzák. A *hasznosság* (utilitás) kritériumok pedig a költséghatékonyságot és az etikai szabályokat jelentik. Állatkísérletek esetén különösen fontos a 3R-szabály⁷ betartása (Brooks és Dunnett, 2009).

A viselkedés-élettani vizsgálatok során a laboratóriumi rágcsálók számos tulajdonsága/paramétere kvantifikálható. Ide sorolhatjuk a különböző motoros/szenzoros funkciókat mérő teszteket (nyílt porond teszt, szagdiszkriminációs teszt, farokcsípés teszt, stb.) és a kognitív, tanulási képességet mérő teszteket (sugárlabirintus, Morris-féle vízilabirintus, új tárgy felismerés teszt, erőltetett úszás teszt, stb.).

A nyílt porond tesztet Calvin S. Hall fejlesztette ki az 1930-as években. Patkányokat helyezett egy 2,13 méter oldal hosszúságú négyzet alaprajzú dobozba, majd 49 darab kisebb

⁶ A bikukullin a GABA_A-receptorok kompetitív antagonistája. A tartós bikukullin kezelés a gátlás gátlásával egyenértékű, vagyis serkentést okoz.

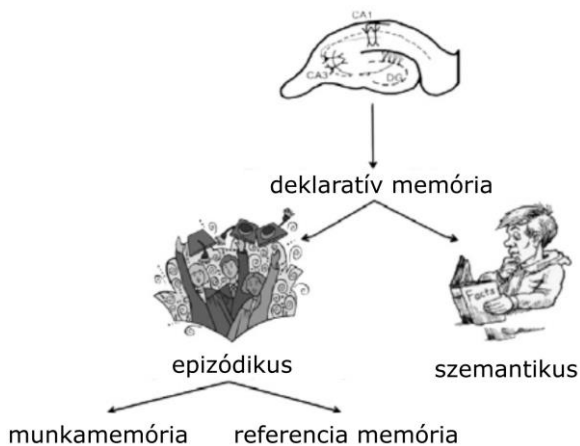
⁷ A 3R-szabály az angol reduction (állatszám csökkentés), replacement (helyettesítés alacsonyabb rendű állatokkal) és refinement (kísérleti körülmények javítása) szavakból alkotott előírások összessége.

négyzetre osztotta azt. A középső régiót egy kisebb hálóval vette körbe, majd élelmet helyezett a hálón belülre. Megfigyelései a mai napig helytállóak, ugyanis a patkányok csak akkor merészkedtek a hálóval körbevett középső régióba, ha ott élelem volt elhelyezve. Ebből azt a következtetést vonta le, hogy a patkányok félnek a nagyobb nyílt terektől és csak jutalom reményében merészkednek oda (Hall, 1934). A mai napig sem igazán változott a teszt kivitelezése, adott időegység alatt a kísérleti állatok mozgásának és explorációs tevékenységének nyomonkövetése a cél (Prut és Belzung, 2003).

Ennaceur és Delacour az 1980-as évek végén fejlesztette tovább a nyílt porond tesztet, amelybe először egy pár egyforma, majd bizonyos idő elteltével egy régi (már habituált) és egy új tárgyat helyeztek. Vizsgálatuk célja a rágcsálók új tárgy felismerési képességének a mérése volt. Az új tárgy felismerése teszt alkalmas a munkamemória, figyelem, szorongás vizsgálatára is. A teszt során a kísérleti állatok rövid idejű, középhosszú és akár a hosszú távú memóriáját is mérhetjük. A két vizsgálat között eltelt idő (retenciós idő) szabja meg, hogy milyen típusú memóriát lehet vizsgálni a módszerrel (Antunes és Biala, 2012).

A tanulást/memóriát vizsgáló tesztekre általánosságban igaz, hogy nem az állat spontán, hanem a maga által, saját tempójában kialakított viselkedését méri. Ezek a tesztek az állatok non-deklaratív (implicit) és deklaratív (explicit) memóriáját képesek vizsgálni.

A deklaratív memória az a memória típus, amely az adatok, tények, összefüggések kódolásáért felelős **(15. ábra)**. Ezt a memória típust tovább oszthatjuk két csoportra, az epizódikus és a szemantikus memóriára. Az epizódikus memória Tulving megfogalmazása szerint a következő: „Az epizódikus memória olyan emléknymok összesége, amely az időben szerveződő események vagy epizódok feldolgozását és tárolását végzi, térbeli asszociációkat képezve ezek egységei között.” (Tulving, 2002). A szemantikus memória a tényszerű adatok, információk rögzítéséért felelős. Az epizódikus memória is tovább osztható két memória altípusra. A munkamemória olyan rövid ideig tárolt emléknymokat takar, amely az adott cselekvés alatt játszik fontos szerepet. Például a klasszikus sugárlabirintusban



15. ábra A deklaratív memória felosztása. (Sharma és mtsai., 2010 alapján).

munkamemóriának nevezzük azt a képességet, hogy az állat melyik csali kart⁸ látogatta már meg a lehetséges opciók közül. Referencia memóriának nevezzük azt a memória típust, amikor az állatok arra emlékeznek, hogy pontosan melyik karok végén található a csali falatok. A referencia memória kialakulása több időt vesz igénybe, általában egy egész kísérlet sorozat alatt alakul ki. A referencia memória kialakulásához elengedhetetlen új fehérjék szintézise és akár a dendrittűskék morfológiájának/dendrit szakaszok megváltozásával is együtt jár.

Az már évtizedek óta ismert a neurobiológiában, hogy a deklaratív emléknymok kialakításában, rögzítésében és előhívásában a hippocampusnak elsődleges szerepe van. Ezt bizonyítja H. M. esete. H. M. olyan epilepsziás beteg volt, akinek mediális temporális lebenyének nagyrésztét műtéten ronsolták, ezzel kiküszöbölve az epilepsziás állapot kialakulását. A műtétet követően az őt kezelő orvosok arra lettek figyelmesek, hogy H. M. tényekre és a személyes eseményekre vonatkozó emlékei jelentősen romlottak, vagyis deklaratív emlékezete sérült. Ez azt bizonyítja, hogy a hippocampusnak fontos szerepe van a deklaratív memória kialakításában.

O'Keefe és munkatársai elektrofiziológiai mérések során olyan sejteket fedeztek fel a hippocampusban, amelyek csak akkor tüzeltek, amikor az állatok a rendelkezésükre álló terület bizonyos bizonyos pontjain voltak (helysejtek). Ez azt bizonyítja, hogy a hippocampusnak a térbeli tanulás/memória kialakításában is szerepe van (Tulving, 2002; Sharma és mtsai., 2010).

Tolman és Gleitman laboratóriumi patkányokon már az 1940-es évek végén tanulmányozták az állatok térbeli tanulási képességét. Megfigyeléseik szerint az éhes patkányok az útvesztőben a napok múlásával egyre gyorsabban megtalálták a jutalmat. (Tolman és Gleitman, 1949). Kísérleteikben egy T-labirintusban vizsgálták a patkányok irányválasztását (**16. ábra**).



16. ábra Sematikus ábrázolása az egyszerű irányválasztásos labirintus teszteknek. (Sharma és mtsai., 2010 alapján).

⁸ A tanulási tesztekben csali karoknak nevezik azokat a karokat, amelyben az állat számára jutalmat helyeztek el.

A T-/Y-labirintusok alapvetően csak a munkamemóriát képesek mérni, de a bonyolultabb felépítésű és komplexebb tesztek, mint például a sugárlabirintus és a Morris-féle vízilabirintus tesztben mindkettő paraméter kvantifikálható. A sugárlabirintus többnyire 8, 16 vagy 32 karból álló útvesztő, amelyben az állatok feladata, hogy megtalálják a csali morzsákat (**17. ábra**). A tesztel képesek vagyunk monitorozni az állatok memória típusainak hibáit. Ilyen például, ha az állatok újra belépnek egy csali karba, ahol előzőleg már elfogyasztották a jutalmat, ezt nevezzük munkamemória hibának. Azt a hibát, amikor az állat üres karba lép be, referencia memória hibának nevezzük. A sugárlabirintus teszt hátrányai közé sorolható, hogy az állatok olyan stratégiát is választhatnak, amelyben motoros tanulással tanulják meg, hogy melyik karokban vannak a csali morzsák (Sharma és mtsai., 2010).



sugárlabirintus



Morris-féle
vízilabirintus

A Morris-féle vízilabirintus tesztet Richard G. M. Morris írta le az 1980-as évek közepén (**17. ábra**) (Morris, 1984). A tesztben az állatoknak egy vízzel töltött medencében kell a

17. ábra Sematikus ábrázolása a sugárlabirintusnak és a Morris-féle vízilabirintusnak. (Sharma és mtsai., 2010 alapján).

lehető legrövidebb idő alatt megtalálni a számukra menekülést jelentő, de nem látható szigetet. A vízilabirintus teszt a sugárlabirintushoz képest nagyobb stresszt jelent az állatoknak, de előnye, hogy nem szükséges az állatok tömegének csökkentése a teszt előtt.

4. Célkitűzések

Doktori munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a központi idegrendszerben nagy mennyiségben előforduló PKD a neuronális plaszticitási folyamatokban részt vesz-e, a dendrittüskék mennyiségi, minőségi tulajdonságaira hatással van-e és a különböző tanulási folyamatokat befolyásolja-e.

- A dendrittüskék kémiai ingerléssel kiváltott morfológiai megváltozása során kimutatható-e a PKD aktiválódása?
- Milyen jelátviteli útvonalakon képes szabályozni a dendrittüskék morfológiai átalakulását a PKD?
- Hogyan változtatja meg *in vitro* a dendrittüskék morfológiáját a PKD domináns-negatív, mutáns formájának túltermeltetése és farmakológiai gátlása?
- Hogyan változik meg a hippocampális piramissejtek dendrittüskéinek alakja, ha a PKD domináns-negatív, mutáns formáját szövetspecifikusan túltermeltetjük transzgenikus egerek hippocampusában?
- Hatással van-e az állatok általános mozgásmintázatára, kognitív memóriájára és a térbeli tanulási képességére a PKD domináns-negatív, mutáns formájának túltermeltetése?

5. Anyagok és módszerek

5.1. A kísérletekhez használt állatok tartása

A kísérletekhez használt CD1, CaMKII α -rtTAII (Michalon és mtsai., 2005) és kdPKD-EGFP (Czöndör és mtsai., 2009) transzgenikus egértörzseket az ELTE-TTK Biológiai Intézet és a Stuttgarti Egyetem Sejtbiológiai és Immunológiai Intézet állatházában tartottuk, állandó 22 \pm 1 °C hőmérséklet és 12 órás fény/sötét ciklus mellett. Az állatok számára a víz és a táplálék *ad libitum* elérhető volt. A doxiciklint 6 mg/g dózisban a rágcsló tápba kevertük, amelyet az állatok 16 héten keresztül szabadon fogyaszthattak. Az összes kísérlet elvégzése során betartottuk a 40/2013. (II. 14.) számú kormányrendelet irányelveit és általános rendelkezéseit. A kísérletet végző személy és az állatházak is rendelkeznek az állatkísérletek elvégzéséhez szükséges engedéllyel (PEI/001/1108-4/2013 és PEI/001/1109-4/2013).

5.2. Sejttenyésztés

A primer hippocampális sejttenyésztéseinket CD1-es egerek embrióiból készítettük az anyák vemhességének 17-18. napján. A hippocampusok izolálását, a sejtek disszociáltatását és a tenyésztőedényekbe történő kiültetését Czöndör és mtsai., 2009-es cikkében leírtak alapján végeztük el. A kísérleteinkhez 24 lyukú, 13 mm átmérőjű üveglemezeket tartalmazó tenyésztőedényeket (Greiner, Németország) használtunk, amelyeket 0,002 mg/ml koncentrációjú poli-L-lizinnel (PLL) kezeltünk (Sigma, Magyarország). A száradást követően 2 μ g/cm² laminin kezelést alkalmaztunk (Sigma, Magyarország). A kiültetés során lyukanként 1,3-1,5 \times 10⁵ db sejtszámot használtunk, a sejteket 5 % FCS (Invitrogen, Németország), 2 % B27 (Invitrogen, Németország), 0,5 mM Glutamax (Invitrogen, Németország), 40 μ g/ml gentamicin (Hunгарopharma, Magyarország) és 2,5 μ g/ml amphotericin B (Hunгарopharma, Magyarország) összetételű Neurobasal (Invitrogen, Németország) tápfolyadékban ültettük ki. A live cell imaging kísérletekhez 35 mm-es üveg fenekű, poli-L-lizinezett és lamininezett tenyésztőedényekbe (Greiner, Németország) 3,8-4 \times 10⁵ db sejtet ültettünk ki. A 24 lyukú és 35 mm-es tenyésztőedényekben a sejtek kezelése a továbbiakban megegyező volt. A kiültetést követő első napon (DIV1) teljes tápcserét végeztünk, DIV4-en pedig a felülúszó egy harmadát lecseréltük FCS-mentes, friss tápfolyadékra. DIV4-5 között citozin-arabinofuranozid (CAR, 10 μ M; Sigma, Magyarország) kezelést alkalmaztunk a gliális növekedés leállítása végett. A sejtek 37 °C hőmérsékleten, 5 % CO₂ szint mellett szövettenyésztő inkubátorban fejlődtek.

5.3. Transzfekció

A dendrittüske morfológiát/motilitást és a PKD aktivitást meghatározó kísérletekhez a transzfekciót DIV10-14 korú hippokampális tenyészeteken a gyártó utasításai szerint végeztük el Lipofectamine2000 (Invitrogen, Németország) reagenssel. A tenyésztőedényekben 0,3-0,5 µg plazmid DNS-t használtunk, 1 µg plazmid:2 µl Lipofectamine2000 arányban (**1. táblázat**). A transzfekciós médiumot 4-5 óra elteltével lecseréltük az eredeti tápfolyadékra. A poszttranszfekciós idő minden esetben 22-24 óra volt.

név	plazmid	hivatkozás
aktin-EGFP	pEGFP-N1-aktin	Clontech
EGFP	pEGFP-N1	Clontech
kdPKD-EGFP	pEGFP-N1-PKD1 K612W	Hausser és mtsai., 2002
PKD aktivitás szenzor	pEGFP-C1-L-pS294-L	Czöndör és mtsai., 2009
PKD aktivitás szenzor S/A	pEGFP-C1-L-pS294A-L	Czöndör és mtsai., 2009

1. táblázat A kísérletekhez használt plazmidok.

5.4. A tenyészetekben alkalmazott plaszticitás-modellek

5.4.1. A glicinnel kiváltott kémiai LTP (GI-LTP)

A glicinnel kiváltott kémiai LTP esetében a sejteket a 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 30 mM glükóz, 0,5 µM tetrodotoxin, 20 µM bikukullin és 1 µM sztrichnin (pH=7,4) összetételű magnéziumion-mentes ECS-ben (extracellular solution) 5 percig inkubáltuk. A glicinnel kiváltott kémiai LTP-t a tápfolyadékhoz adott 200 µM glicinnel indukáltuk, amelyet 3 percig hagytunk a tápfolyadékban, ezt követően visszacseréltük az eredeti glicin- és magnéziumion-mentes ECS-re a tápfolyadékot. A PKD aktivitás meghatározásához (**23. és 24. ábra**) a sejtek az inkubációs idő alatt mindvégig a magnéziumion-mentes extracelluláris folyadékban maradtak. A foszforilált cofilin szint meghatározásához (**27. és 28. ábra**) a sejtek visszakapták az eredeti tápfolyadékukat. Amennyiben kbNB 142-70-nel⁹ gátoltuk a PKD aktivitást, a gátlószert a glicin kezelést megelőző 2 óra alatt is alkalmaztuk. A PDBu-t 1 µM (Sigma, Magyarország), a kbNB 142-70-et 3 µM (Tocris, Egyesült Királyság), az APV-t 50 µM (Tocris, Egyesült Királyság), az MK-801-et 10 µM (Tocris, Egyesült Királyság), a nifedipint 1 µM (Sigma, Magyarország) és az ω-conotoxin MVII C-t 1 µM (Tocris, Egyesült Királyság) koncentrációban használtuk. Az APV (amino-foszfonovaleriánsav) és a kbNB 142-70 a kezelésekk alatt mindvégig jelen volt.

⁹ A kbNB 142-70 egy szelektív PKD gátlószert, amely mindhárom PKD izoformát allosztérrikusan gátolja. Jelenleg a piaci forgalomban elérhető legpotensebb PKD gátlószert.

A GI-LTP során meghatároztuk, hogy a különböző inkubációs idők után a sejtek hány százaléka pusztult el attól függően, hogy a magnéziumion-mentes extracelluláris folyadékot vagy az eredeti tápfolyadékot kapták vissza a sejtek. A tenyészetekről Plan Neofluar 20x/0,5 NA objektívvel ellátott Zeiss HS CellObserver Z.1 mikroszkóppal készítettünk fáziskontraszt felvételeket, amelyhez egy 12 bites AxioCam MRm Rev.3 kamera csatlakozott. Elpusztultnak definiáltuk azokat a sejteket, amelyeknek a sejtmagjuk zsugorodott, piknotizált volt. Az élő sejtek sejtmagja ezzel szemben ép szélű, kerekded sejtalkotóként volt detektálható.

5.4.2. A tartós depolarizációval kiváltott homeosztatisz scaling

A tartós depolarizációhoz 20 mM KCl hozzáadásával 25 mM-ra emeltük a káliumion koncentrációját a tápfolyadékban. Kontrollként 20 mM NaCl kezelést alkalmaztunk, hogy a KCl kezeléshez hasonló ozmotikus terhelést alakítsunk ki.

5.5. A tenyészetek feldolgozása

5.5.1. Immuncitokémia

A túlélési idők leteltével a sejteket 4 °C hőmérsékletű, 4 %-os PBS-ben (foszfát puffer) oldott paraformaldehiddel fixáltuk 20 percig. A sejtek permeabilizálását PBS-ben oldott, 0,1 % Triton X-100-zal szobahőmérsékleten végeztük 5 percig. A blokkolás minimum egy órán át, 2 % BSA-PBS-Na₃ oldattal, szobahőmérsékleten zajlott. Az elsődleges antitesteket [anti-pS294 (anti-PI4KIIIβ-pS294, nyúl, 1:1500; Hausser és mtsai., 2005), anti-p-cofilin (pSer3, nyúl, 1:1000, Cell Signaling, Egyesült Államok) és anti-PSD-95 (egér, 1:500, Thermo Scientific, Egyesült Államok)] blokkolóban oldva egy éjszakán át alkalmaztuk 4 °C-on. A következő napon háromszoros PBS-es mosás után az anti-PI4KIIIβ-pS294 kimutatására anti-nyúl IgG konjugált Alexa-546-ot (1:500; Invitrogen, Németország), az anti-p-cofilin kimutatására anti-nyúl IgG konjugált Alexa-488-at (1:500; Invitrogen, Németország), az anti-PSD-95 megjelenítésére pedig anti-egér IgG konjugált Alexa-546-ot (1:300 Invitrogen, Németország) használtunk. A másodlagos antitesteket blokkolóban oldottuk és szobahőmérsékleten minimum 1,5 órán keresztül alkalmaztuk. A mintákat Mowiol 4.88-al (Polysciences, Németország) fedtük.

5.5.2. Fluoreszcens fénymikroszkópia és a felvételek kvantitatív elemzése

Az összes felvétel elkészítése során végig arra törekedtünk, hogy olyan piramissejteket válasszunk, amelyek transzfekció esetén gyenge vagy közepes expressziót mutatnak, továbbá az idegsejtek ép dendritfával és nem fragmentált, egészséges axonnal rendelkezzenek.

A minták feldolgozása során a konfokális felvételeket Zeiss LSM 710 (Plan Achromat 63x/1,4 NA immerziós objektív) vagy Olympus Fluoview 500 LSM IX81 inverz mikroszkóppal (Plan Achromat 60x/1,4 NA immerziós objektív) készítettük. A látótérket egységes beállításokkal és szekvenciális szkennelés mellett fotóztuk, amennyiben ezt a kísérlet típusa megkövetelte. A felvételek kvantitatív elemzéséhez minden esetben NIH Image J/Fiji képelemző szoftvert használtunk.

A PKD aktivitás meghatározásához a dendritágakról legalább 3 síkban, 0,3 mikrométerenként felvételeket készítettünk. Az EGFP jel detektálására 488 nm-es multi-argon, az Alexa-546-tal jelzett anti-PI4KIII β -pS294 gerjesztésére 543 nm-es hélium-neon lézert alkalmaztunk. A csatornák közötti áthallás kiküszöbölése érdekében megfelelő emissziós szűrőket és szekvenciális szkennelést alkalmaztunk (EGFP jel esetében BA505-525, az Alexa-546-nál BA560-600 szűrők). Egy adott dendrittüske elemzése során az egymás feletti 3 z-rétegből projektált képeket készítettünk. A projekció során a rétegek egyes pixel értékeinek az átlagából készült a projektált kép (Average Intensity), ahol a legélesebb sík a középső volt. Az EGFP jel alapján körberajzoltuk a dendrittüske fejét és közel azonos méretű területet a háttérből. A kiválasztott területeken belül meghatároztuk mindkét csatorna intenzitásértékeit. Az adott csatornához tartozó háttér intenzitás értékeket kivontuk a dendrittüske fejek intenzitás értékeiből. Az adott dendrittüskekre jellemző relatív intenzitás megadásához az a-pS294 intenzitás értékét elosztottuk az EGFP jel intenzitásával.

A p-cofilin szint meghatározásához legalább 3 síkban 0,3 mikrométerenként készítettünk rétegfelvételeket. Az Alexa-488-cal jelzett anti-p-cofilin jelhez 488 nm-es multi-argon, az Alexa-546-tal jelzett anti-PSD-95 jel detektálásához 543 nm-es hélium-neon lézergörjesztést alkalmaztunk. A csatornák közötti áthallás kiküszöbölése érdekében megfelelő emissziós szűrőket és szekvenciális szkennelést alkalmaztunk (az Alexa-488 jel esetében BA505-525, az Alexa-546-nál BA560-600 szűrők). A rétegek közül kiválasztottuk azt, amelyben az adott PSD-95 jel a síkjában a legnagyobb kiterjedésű volt. A PSD-95 struktúrát körberajzoltuk és meghatároztuk a ROI-k¹⁰ területét, valamint az adott területen belüli p-cofilin intenzitás értéket. Az adott PSD-95 struktúrára jellemző relatív p-cofilin intenzitás érték megadásához a p-cofilin intenzitását elosztottuk a PSD-95 jel alapján meghatározott posztzinaptikus denzitás területével.

A dendrittüske morfológia meghatározásához a dendritágakról teljes mélységükben 0,3 mikrométerenként készítettünk rétegfelvételeket, amelyeket projektáltunk. A projekció

¹⁰ Az angol region of interest kifejezésből eredő mozaikszó. A számítógépes képfeldolgozásban használt gyakori kifejezés, amely az elemzés szempontjából fontos struktúrát fed le.

során a rétegek egyes pixel értékeinek átlagából készült a projektált kép (Average Intensity). A dendrittűskék 3 jellemző paraméterét (a dendrittüske hosszúsága, nyak- és fejszélessége) az NIH ImageJ/Fiji program segítségével egyenként, manuálisan lemértük és kiszámoltuk a fejszélesség/nyakszélesség (HN-index) arányt. A dendrittűskék tipizálását az alábbi módon végeztük el: amennyiben a HN-index 1,2 felett volt és a túskehossz meghaladta a 0,8 μm -t, akkor az adott tuskét a gomba morfológiához soroltuk, ha a HN-index 1,2 alatti volt, de a dendrittüske hosszabb volt, mint 0,8 μm , akkor a fonalas kategóriába került. Minden más esetben a dendrittűskét a zömök típusba soroltuk (31., 33., 34. és 35. ábra).

5.6. Live-cell imaging felvételek készítése

A dendritikus filopódiumok motilitásának meghatározásához live-cell imaging felvételeket készítettünk. Ehhez a sejtek eredeti tenyésztőmédiumát lecseréltük imaging oldatra (142 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 25 mM HEPES, 5 mM glükóz, 0,8 mM MgCl_2 ; pH=7,4). A felvételeket 37 °C hőmérsékleten készítettük. A felvételek készítéséhez inverz mikroszkópot (Plan APOCHROMAT 63x/1,4 NA immerziós objektívvel ellátott Zeiss HS CellObserver rendszer) használtunk, amelyhez egy 12 bites AxioCam MRm kamera csatlakozott. A dendritágakról a legélesebb sík kiválasztása után legalább 3 síkban 0,5 mikrométerenként rétegfelvételeket készítettünk. A képsorozatok hossza legalább 20 perc volt, a képkockák 2 másodpercenként készültek. A dendritikus filopódiumok tömegközéppontjának meghatározásához a Tárnok és mtsai., 2015-ös publikációban alkalmazott metódust használtuk. A szoftver közvetlenül elérhető ezen a linken: <http://cnblab.elte.hu/dfma>.

5.7. A transzgén állatok hippokampuszából készített preparátumok feldolgozása

5.7.1. Fénymikroszkópia

10-12 hét doxiciklin kezelés után a $\text{kdPKD-EGFP}^{+/-}$ és $\text{CaMKII}\alpha\text{-rtTA2}^{+/-}$ genotípusú (kettős transzgén) állatokat és a $\text{kdPKD-EGFP}^{+/-}$ és $\text{CaMKII}\alpha\text{-rtTA2}^{-/-}$ genotípusú (egyszeres transzgén) állatokat pentobarbitállal (60 mg/kg, i.p.) túlaltattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk 4 °C hőmérsékletű, 4 %-os, PBS-ben oldott paraformaldehiddel. Az agyakat kivettük, egy órás szobahőmérsékleten történő utófixálás (4 %-os, PBS-ben oldott paraformaldehidben) után krioprotekció céljából egy éjszakára 30 %-os cukor (PBS-ben oldva) oldatba tettük. Az agyakból a peroxidáz immunfestéshez 60 μm vastagságú koronális metszeteket készítettünk vibratómmal (Vibratome, Egyesült Államok). A metszetek permeabilizálását PBS-ben oldott, 0,5 % Triton X-100-zal szobahőmérsékleten végeztük 1 órán át. Az endogén peroxidáz blokkolásához 1 %-os H_2O_2 -os kezelést alkalmaztunk PBS-ben

oldva. A blokkolás minimum két órán át, 2 % BSA-PBS- NaN_3 és 0,3 % Triton X-100 oldattal, szobahőmérsékleten zajlott. A mintákat poliklonális nyúl anti-GFP-vel (1:1000; Invitrogen, Németország), blokkolóban oldva inkubáltuk. A biotinilált anti-nyúl IgG-t (1:100; Invitrogen, Németország) követően extravidin kapcsolt peroxidáz enzim keveréket adtunk (1:5000; Sigma, Magyarország). Végül 0,01 %-os H_2O_2 -al és 0,05 %-os Ni-DAB-bal megjelenítettük az EGFP pozitív struktúrákat. A mintákat felszálló alkohol sorral víztelenítettük, majd D.P.X.-szel (Sigma, Magyarország) fedtük. A felvételek készítéséhez Plan Neofluar 20x/0,5 NA objektívvel ellátott Zeiss HS CellObserver Z.1 mikroszkópot használtunk, amelyhez egy 12 bites AxioCam MRm Rev.3 kamera csatlakozott.

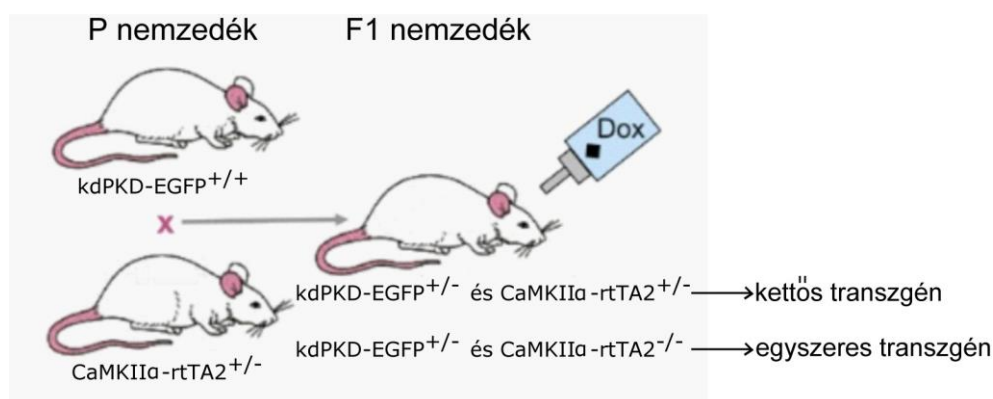
5.7.2. Elektronmikroszkópia

10-12 hét doxiciklin kezelés után a kettős és egyszeres transzgén állatokat pentobarbitállal (60 mg/kg, i.p.) túlaltattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk 4 °C hőmérsékletű, 4 %-os, PBS-ben oldott paraformaldehiddel, 0,5 %-os glutáraldehiddel és 1 %-os pikrinsavval. Az agyakat kivettük, egy órás szobahőmérsékleten történő utófixálás (4 %-os, PBS-ben oldott paraformaldehidben) után krioprotekció céljából egy éjszakára 30 %-os cukor (PBS-ben oldva) oldatba tettük. Az agyakból a peroxidáz immunfestéshez 60 μm vastagságú koronális metszeteket készítettünk vibratómmal (Vibratome, Egyesült Államok). A metszetek permeabilizálását PBS-ben oldott, 0,5 % Triton X-100-zal szobahőmérsékleten végeztük 1 órán át. Az endogén peroxidáz blokkolásához 1 %-os H_2O_2 -os kezelést alkalmaztunk PBS-ben oldva. A blokkolás minimum két órán át, 2 % BSA-PBS- NaN_3 és 0,3 % Triton X-100 oldattal, szobahőmérsékleten zajlott. A mintákat poliklonális nyúl anti-GFP-vel (1:1000; Invitrogen, Németország) a blokkolóban oldva inkubáltuk. A biotinilált anti-nyúl IgG-t (1:100; Invitrogen, Németország) követően extravidin kapcsolt peroxidáz enzim keveréket adtunk (1:5000; Sigma, Magyarország). Végül 0,01 %-os H_2O_2 -al és 0,05 %-os Ni-DAB-bal megjelenítettük az EGFP pozitív struktúrákat. Az ultravékony metszetek fotózásához JEOL T1011 elektronmikroszkópot használtunk, amelyhez 12 bites, 1024x1024 felbontású CCD kamera csatlakozott. A hippocampusz CA1 régió stratum radiatumában és a CA3 régió stratum lucidumában véletlenszerűen kiválasztott területekről készítettünk felvételeket. Az elemzés során csak olyan dendrittüske profilokat mértünk le, amelyekben egyértelműen tudtuk azonosítani a PSD-t és a preszinaptikus területen a szinaptikus vezikulákat. Az elkészült fotókon az NIH ImageJ/Fiji alkalmazás segítségével lemértük a tüskék területét, kerületét, a PSD hosszúságát és meghatároztuk cirkularitásukat ($4\pi \cdot \text{terület/kerület}^2$). A kiértékeléshez csoportonként 3-3 állatot használtunk.

5.8. Viselkedés-élettani vizsgálatok

5.8.1. A vizsgálatokhoz használt állatok genotípusa

A viselkedés vizsgálatokhoz használt állatok szüleinek (P nemzedék) a genotípusa $kdPKD-EGFP^{+/+}$ és $CaMKII\alpha-rtTA2^{+/-}$ volt, így az F1 nemzedéket közel 50-50%-ban egyszeres transzgén (azaz $kdPKD-EGFP^{+/-}$ és $CaMKII\alpha-rtTA2^{-/-}$), illetve a doxiciklin kezelést követően kináz-inaktív $kdPKD-EGFP$ -t expresszáló kettős transzgén (azaz $kdPKD-EGFP^{+/-}$ és $CaMKII\alpha-rtTA2^{+/-}$) állatok alkották (**18. ábra**). A kettős transzgén egerekben mindkét gén megtalálható, így a reverz transzaktivátor fehérje átíródása és a doxiciklin adagolásának következtében a kináz inaktív PKD mutáns kódoló gén átírása megindul. Mivel az egyszeres transzgén állatokban a reverz transzaktivátor fehérjét kódoló gén nincs jelen, a doxiciklin kezelés hatására sem indulhat meg a kináz inaktív PKD mutáns kódoló transzgén átírása, így ezeket az egyedeket kontrollként használtuk. Az állatok 8 hetes koruktól 24 hetes korukig kaptak doxiciklin kezelést. Mindkét csoportot 16-16 hím állat alkotta.



18. ábra A viselkedés-élettani vizsgálatokhoz használt állatok tenyésztésének sematikus ábrázolása. A P nemzedék pároztatásából született utódok genotípusától függően és doxiciklin kezelés hatására a kináz inaktív PKD mutáns termelték a hippocampusban.

5.8.2. A nyílt porond teszt

A nyílt porond tesztet a doxiciklin adagolásától kezdve az 5. héten hajtottuk végre. Az egereket egy négyzet alakú, $48 \times 48 \times 40$ cm méretű nyitott porond közepére tettük, ahol 5 percen keresztül követtük nyomon a mozgásukat. A vizsgálatot még sötétben, az állatok aktív periódusa alatt, a hajnali órákban hajtottuk végre. A porondot az egyes állatok mérései között a szagnyomok eltüntetéséért Tween-20 (Sigma, Magyarország) 0,5 %-os oldatával tisztítottuk meg. Az elkészült felvételeket a Conducta felvevő és analízáló rendszerrel elemeztük ki (Experimetria Kft., Magyarország). A nyílt porond teszt alatt fehér zajt alkalmaztunk.

5.8.3. Az új objektum felismerés teszt

Az új objektum felismerés tesztet a doxiciklin kezelés előtt és a kezelés 12 hetében csináltuk meg. A teszt során fehér zajt alkalmaztunk. Mindkét állatcsoport tagjait kézhez szoktattuk a kísérlet kezdete előtt, ami 2-3 napot vett igénybe. Ezt követően a kísérlethez 42×25×18 cm méretű dobozokat használtunk. Mivel a kísérlet különböző lépési során az egerek mindig a saját dobozukba kerültek vissza, ebben az esetben a szagnyomok eltüntetésére nem volt szükség. A familiarizáció során (0. napon) az állatokat a ketrectársaikkal együtt az üres dobozokba helyeztük 5 percre, a 0. nap végén pedig az állatoktól elvettük a táplálékukat, ezzel fokozva a motivációjukat. A következő napon két egyforma, egyenként 8×3,5×3 cm méretű műanyagból készült téglatestet használtunk objektumként (ún. akvizíció). Az akvizíció után 5 óra elteltével az egyik téglatest helyére egy 8×6×3 cm méretű, henger alakú szintén műanyagból készült új tárgyat helyeztünk (ún. retenció). A felvételeket egy The Imaging Source USB 2.0 monokróm, 1/3" CCD kamerával (Németország), egyenletes megvilágítás mellett rögzítettük. Az akvizíció és a retenció ideje is 5-5 perc volt. A felvételeken lemértük, hogy az állatok mennyi ideig szaglásszák a tárgyakat. Szaglászásnak azt a viselkedést neveztük, amikor az állat a tárgyak melletti területről és nem róla szagolgatta az objektumokat. Azokat az egereket, amelyek az akvizíció alatt legalább 8-8 másodpercet nem töltöttek a tárgyak szimatolásával, kizártuk a mérésből. A 0. héten 2 kettős transzgén állat, a 12. héten 1 kontroll állat adatait hagytuk ki az elemzésből. A tárgyak vizsgálatával töltött értékekből diszkriminációs indexet (DI) számoltunk.

$$DI = \frac{\text{az új tárgy vizsgálatával töltött idő} - \text{a régi tárgy vizsgálatával töltött idő}}{\text{az új tárgy vizsgálatával töltött idő} + \text{a régi tárgy vizsgálatával töltött idő}}$$

5.8.4. A Morris-féle vízi labirintus teszt

A Morris-féle vízi labirintus tesztet a doxiciklin adagolásának 9. és 10. hetében végeztük el. A teszt alatt fehér zajt alkalmaztunk. A kísérlethez egy 105 cm átmérőjű feketére festett, 25 cm magasan 22 ± 1 °C hőmérsékletű vízzel feltöltött medencét használtunk. A medencét négy kvadránsra osztottuk, a 8 cm átmérőjű, rejtett sziget a víz felszíne alatt 1 cm-rel volt. A medence szélére és a medence köré, a falra is helyeztünk egyszerű jeleket, amelyek a tájékozódást szolgálták. A kísérlet ideje alatt mindennap legalább négyszer úsztak az állatok, az indulási pontjuk az adott napon mindig más kvadránsból történt, a kiindulási kvadráns pedig a kísérlet során naponta változott. A 0. napon az állatok számára a sziget látható volt és egy percet úszhattak a medencében. Amennyiben egyből megtalálták a szigetet, igyekeztünk rajta

tartani őket kb. 20 másodpercig, ha nem találták meg, akkor a 0. napon még rátettük őket. Az első naptól kezdve továbbra is 60 másodpercük volt az állatoknak, hogy megtalálják a szigetet, azonban sikertelenség esetén a medencéből egyből kivettük őket. Az 5. és a 10. napon plusz egy mérést iktattunk be, amikor is kivettük a szigetet és lemértük, hogy mennyi időt és utat töltenek az állatok az eredeti sziget feletti, annál háromszor nagyobb sugarú körben a mérés 30 másodperce alatt (ún. probe trial, azaz próba úsztatás). A felvételeket egy The Imaging Source USB 2.0 monokróm, 1/3" CCD kamerával (Németország), egyenletes megvilágítás mellett rögzítettük. Az úszás után az állatok egy infralámpával megvilágított dobozba kerültek, hogy száradásukat meggyorsítsuk. A felvételeket az AnimalTracker, Gulyás Márton, laboratóriumunk munkatársa által készített szemi-automata viselkedés elemző szoftver segítségével elemeztük (Gulyás és mtsai., 2016). Az elemzés során az állatok által megtett utat, eltöltött időt és úszási sebességet mértünk. A szoftver a <http://animaltracker.elte.hu/main> oldalon érhető el.

5.8.5. A 8-karú sugárlabirintus teszt

A 8-karú sugárlabirintus tesztet a doxiciklines etetés 15. és 16. hetében végeztük el. Egy 101,5 cm átmérőjű, 0,5 cm falvastagságú, 24,5 cm centrum átmérőjű, átlátszó plexiből készült labirintust használtunk, amelyet 30 cm magasan megemeltünk. A labirintus alját fekete kartonnal bevontuk, hogy az egerek ne lássanak át rajta. A sugárlabirintus köré a falra egyszerű jeleket helyeztünk, amelyek a tájékozódást szolgálták. Az egyes mérések között a szagnyomok eltüntetéséhez 0,5 % Tween 20-szal (Sigma, Magyarország) töröltük át a labirintust. Az állatok a habituációtól kezdve normál táplálékuk kétharmadát kapták, hogy az élelemkereső magatartást elősegítsük. A habituáció végére az állatok testsúlya kb. 10 %-kal csökkent. A labirintusba helyezett jutalomfalat (csali) egy-egy morzsa Győri Édes keksz volt minden esetben. Az állatok a habituáció kezdetén három napon keresztül, ketrectársaikkal együtt napi 5-5 percet tölthettek a labirintusban. A negyediktől a nyolcadik napig az egerek már egyesével ismerkedtek a labirintussal. Ebben a periódusban a morzsák véletlenszerűen voltak elhelyezve a karok végén és a karokban. Az éles mérések csak a habituáció után kezdődtek. Ekkor minden egér napi egyszer futott. Az egereket egy elmozdítható, henger alakú plexibe helyeztük a centrum régióban. A mérés kezdetekor a hengert felemeltük, így az állatok irányválasztását nem befolyásoltuk. A mérések során minden második kar végére egy darabka Győri Édes kekszet helyeztünk (ún. csali morzsa). A tesztet akkor vettük sikeresnek, ha az egerek megtalálták mind a négy csali morzsát, ekkor az állatokat kivettük a sugárlabirintusból. Ha 3 perc alatt az egerek nem találták meg a falatokat, akkor az egér aznapi eredményével nem számoltunk. A

felvételeket egy The Imaging Source USB 2.0 monokróm, 1/3" CCD kamerával (Németország), egyenletes megvilágítás mellett rögzítettük. A felvételeket az AnimalTracker, Gulyás Márton, laboratóriumunk munkatársa által készített szemi-automata viselkedés elemző szoftver segítségével elemeztük (Gulyás és mtsai., 2016). Az elemzés során az állatok által megtett utat, a labirintusban eltöltött időt, a karokba lépések számát és a futási sebességet mértük. A szoftver az <http://animaltracker.elte.hu/main> oldalon elérhető.

5.9. Az adatok statisztikai elemzése

A statisztikai elemzések során az SPSS Statistics 21 (IBM, Egyesült Államok) statisztikai programot használtunk. Az eltérések szignifikanciájának megállapítására normál eloszlású adatok esetében ANOVA-tesztet követő *post-hoc* analíziseket, a nem normál eloszlású minták esetén Mann-Whitney-U-tesztet alkalmaztunk ($p < 0,05$). Az adatok normalitás vizsgálatát Kolmogorov–Smirnov-teszttel végeztük. Az ábrázolt adatok minden esetben az átlag \pm SEM értékeket jelölik.

A dolgozatban bemutatott eredmények, illetve a megjelent publikációk természetesen csapatmunkában születtek. A disszertációban ahol ezt külön nem említem ott a kísérletek kivitelezése és a kiértékelése döntően a saját munkám volt.

6. Eredmények

6.1. A tenyészetekben alkalmazott plaszticitási modellek hatása a dendrittüskék morfológiájára

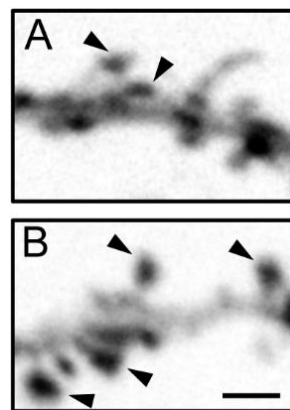
6.1.1. A glicinnel kiváltott kémiai LTP (GI-LTP) során a dendrittüskék feje kiszélesedik

A hippocampális tenyészetekben a strukturális plaszticitás előidézéséhez a glicinnel kiváltott kémiai LTP módszert (GI-LTP) alkalmaztunk. Az eljárás lényege, hogy a tenyésztett idegsejtekben hasonló változások zajlanak le (pl. a túskefejek kiszélesednek), mint a tanulás és memória kialakuláshoz elengedhetetlen LTP során *in vivo*, az intakt agyszövetben (Molnár, 2011).

A dendrittüskék morfológiájának kialakításában az aktin vázrendszer dinamikája fontos szerepet tölt be. A fluoreszcensen jelzett aktin molekulák a dendrittüskék fejében, az F-aktin szintézis helyén halmozódnak fel, így a fluoreszcens jel a dendrittüskék fejét erősen kirajzolja (**19. ábra**). A kontroll felvételekhez viszonyítva egyértelműen látszik, hogy 30 perc túlélés után a glicin kezelt dendrittüskék feje kiszélesedik, gyakoribbá válnak a gomba morfológiájú tüskék. Ezek a megfigyelések az irodalmi adatokkal egybevágóak (Fortin és mtsai., 2010).

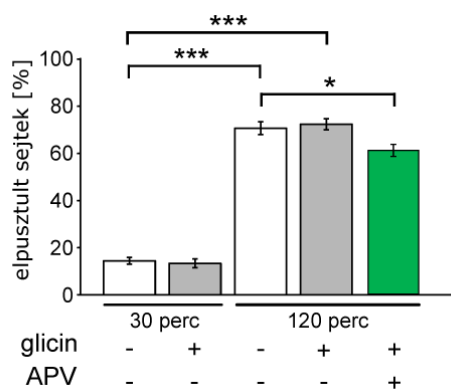
A glicinnel kiváltott kémiai LTP kezelés során általában a gyors, maximum egy órán belül lezajló változásokat vizsgálják (Fortin és mtsai., 2010; Jaafari és mtsai., 2013). A dendrittüskékben bekövetkező tartós strukturális változások vizsgálatához azonban hosszabb túlélési idejű kísérleteket is szerettünk volna végezni, így a glicin-kezelést követően két órával is megvizsgáltuk a sejteket. Ha a tenyészeteket a glicines kezelés során is alkalmazott, a hálózati aktivitást gátló extracelluláris oldatban tartottuk, akkor a neuronok jelentős százaléka 2 óra inkubálás után, a glicin kezeléstől függetlenül elpusztult. Ha az extracelluláris oldatban APV is végig jelen volt, akkor a sejtpusztulás szignifikánsan alacsonyabb volt (**20. és 21. ábra**).

A hosszabb távú túlélést meggátló ECS alkalmazása helyett így azokban a kísérletekben, ahol a GI-LTP hatására kialakuló, tartós strukturális változásokat is elemezni kívántuk, változtattunk az eredeti protokollon és a glicines kezelést követően az eredeti tápfolyadékot adtuk vissza a sejteknek. Ebben az esetben a sejtek túlélése nem csökkent és a

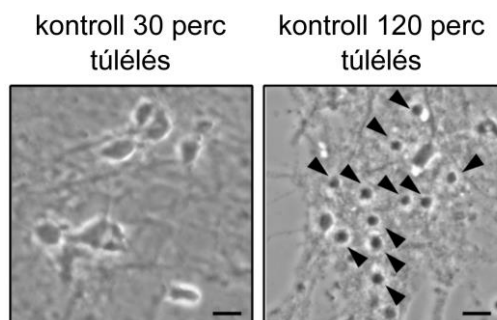


19. ábra Fluoreszcens, invertált felvételek EGFP-vel jelzett aktint túlermelő idegsejtek dendritágairól (DIV14). (A) Kontroll felvétel, (B) 30 perces túlélés után a glicin kezelt (GI-LTP) túske-fejek kiszélesednek. A nyílhegyek a gomba morfológiájú tüskékre mutatnak. Mércé: 2 μ m.

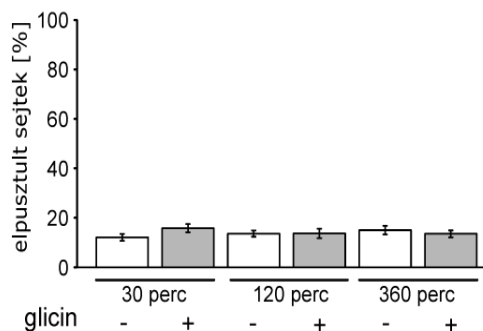
dendrittüskék fejének megnagyobbodása 6 órával a GI-LTP kiváltását követően is látható volt (nincs bemutatva) (**21. ábra**).



20. ábra A glicinnel kiváltott kémiai LTP során használt ECS hatással van a sejtek túlélésére. 30 perc túlélést követően a sejtek néhány százaléka, 2 óra túlélést követően viszont már az idegsejtek jelentős százaléka a glicin jelenlététől függetlenül elpusztult. A túlélő sejtek számát a glicin kezelés során az APV szignifikánsan növelte. Az adatok 2 független tenyészetből származnak, összesen 2213 idegsejt elemzését végeztem el. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. *: $p < 0,05$ vagy ***: $p < 0,001$.



21. ábra 13 napos tenyészetekről készített fáziskontraszt felvételek. A glicinnel kiváltott kémiai LTP során használt ECS-ben a sejtek 30 perc túlélést követően minimális százalékban pusztultak el, viszont 120 perc túlélésnél a neuronok nagy százaléka elpusztult. Az elpusztult sejtek piknotikus, zsugorodott sejtmaggal rendelkeznek (nyílhegyek). Mércé: 10 μ m.



22. ábra A glicinnel kiváltott kémiai LTP során az eredeti táp visszaadását követően 30, 120 és 360 perc túlélést követően sem figyeltünk meg sejtpusztulást. Az adatok 2 független tenyészetből származnak, összesen 5227 idegsejt elemzését végeztem el. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják.

6.1.2. A hosszú idejű KCl kezelés hatására a dendrittüskék feje kiszélesedik

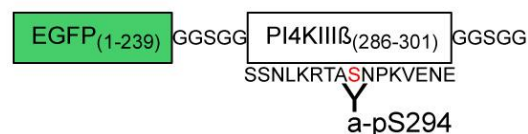
Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a megemelt extracelluláris káliumion szint az idegsejtek strukturális plaszticitásának megváltozásához vezet (Grubb és Burrone, 2010). Kíváncsiak voltunk arra, hogy depolarizáció hatására a tenyésztett idegsejtek dendrittüskéin is megfigyelhetők-e morfológiai változások. Ezért a tenyésztés 10-13. napja között 16 órán át az extracelluláris káliumion szintet 20 mM KCl adagolásával megemeltük. A glicinnel kiváltott, rövid távú morfológiai változásokhoz hasonlóan a dendrittüskék feje a KCl kezelés hatására is kiszélesedett és jelentősen megnőtt az ún. gomba alakú tüskék aránya (**32., 34. és 35. ábra**). A hosszúkás (0,8 mikrométert meghaladó) és kis fejjel rendelkező (a fej/nyak arány, azaz HN-index 1,2 alatti), fonalas alakú protrúziók aránya ezzel szemben lecsökkent. Mindez azt jelzi, hogy a dendrittüskék fejének kiszélesedését a tartós depolarizációval is elő tudjuk idézni.

6.2. Az endogén PKD aktív a dendrittüskékben

6.2.1. Az endogén PKD aktivitás mikroszkópos meghatározása a dendrittüskékben

Kutatócsoportunk vizsgálni kívánta, hogy a dendrittüskék kémiai kezeléssel kiváltott morfológia változásában a PKD aktivitás szerepet játszik-e. Ezért olyan mikroszkópiás technikát kellett alkalmaznunk, amely segítségével lokálisan, a dendrittüskékben tudjuk elemezni a PKD aktivitását. A dendrittüskékben zajló PKD mediált foszforilációs események detektálására így a PKD aktivitás szenzort alkalmaztuk (Czöndör és mtsai., 2009; **23. ábra**).

A PKD aktivitás szenzor egy olyan fúziós fehérje, amelyben az EGFP a PKD által foszforilálható PI4KIII β szekvenciájához kapcsolódik (Fuchs és mtsai., 2009). A PKD aktivitás szenzort az idegsejtekbe transzfekcióval juttattuk be. A termelt fehérje az idegsejtekben egyenletesen oszlott el, a dendritfát és a dendrittüskéket is kirajzolva (**24. ábra**). A PKD által specifikusan foszforilált, 294-es pozícióban lévő szerint immunfestéssel azonosítottuk.

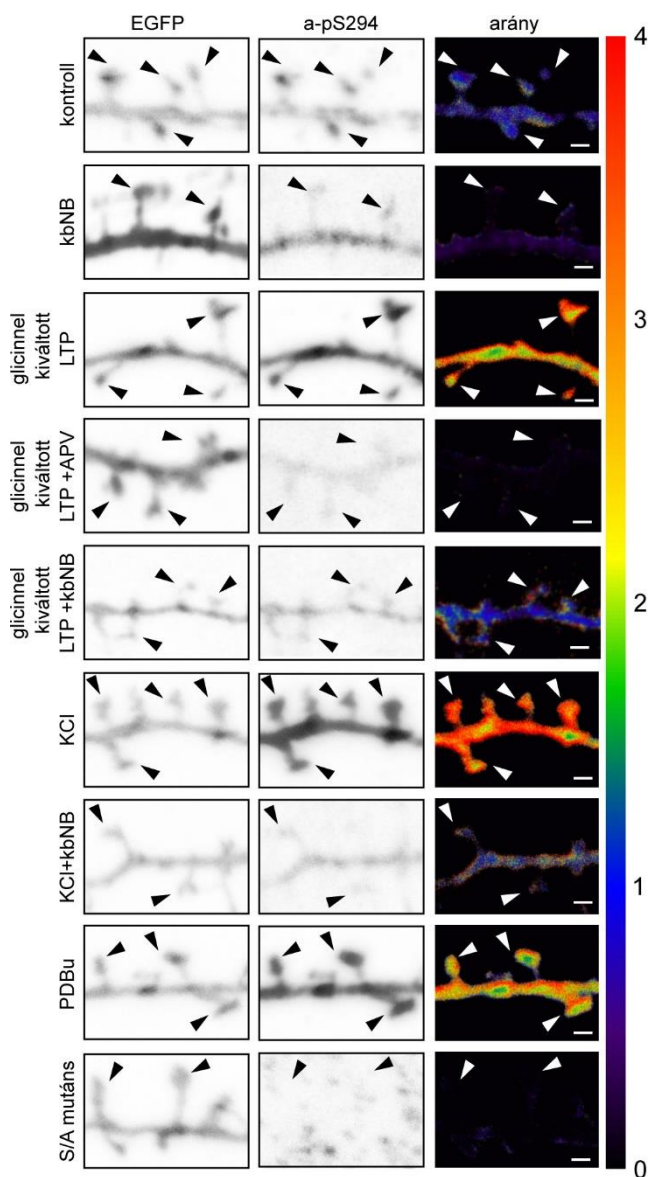


23. ábra Sematikus illusztráció a PKD aktivitás szenzorról. A konstrukció tartalmazza a foszfatidil-inozitol 4-kináz III β (PI4KIII β) egy részletét, amelyen a PKD által foszforilált 294-es szerin is megtalálható, valamint az EGFP szekvenciát. Az a-pS294 antitest az aktivitás szenzor PKD-specifikus szerinjét képes felismerni, így a transzfektált sejtekben az endogén PKD aktivitás lokálisan detektálható.

Mivel a transzfektált sejtekben az aktivitás szenzor nem egyenlő mértékben expresszáldott, az eltérő mértékben kifejeződő konstrukció EGFP intenzitás értékeit az Alexa-546 festékkel jelölt pS294 intenzitásához viszonyítottuk. Az EGFP és Alexa-546 csatornákon készített mikroszkópos felvételekből reprezentatív, ráciometrikus képeket készítettünk, amelyek a PKD aktivitását szemléltetik (a „hideg”, sötétkéék szín az alacsony, míg a „meleg”,

vörös árnyalatok a magas foszforilációs aktivitást jelzik; **24. ábra**). Kísérleteinkben negatív kontrollként a PKD aktivitás szenzor 294, szerin oldalláncának alaninra cserélt, nem foszforilálható mutánsát (PKD aktivitás szenzor S/A) használtuk. Ebben az esetben a pS294 jel intenzitása a festési kontroll szintjén maradt, a dendrittüskékben mért intenzitásértékek a foszforilálható PKD aktivitás szenzorral kapott intenzitásértékektől minden esetben szignifikánsan különböztek (**25. és 26. ábra**).

Az endogén PKD aktivitás gátlására a kbNB 142-70 specifikus gátlószert alkalmaztuk. Mivel ennek jelenlétében a normál tápfolyadékban tartott sejtek dendritfájában és a dendrittüskékben is csökkent a PKD aktivitás szenzor foszforilációjának mértéke, megállapíthatjuk, hogy a PKD normál körülmények mellett is aktív az idegsejtekben (**24. és 26. ábra**).



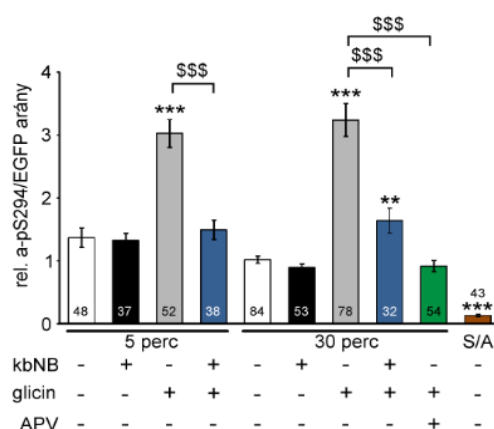
24. ábra A dendrittüskék GI-LTP és KCl *in vitro* kezelésének hatására az endogén PKD aktiválódik. Invertált fluoreszcens és a-pS294/EGFP színes, rációmetrikus felvételek a tercier dendritágakon lokalizált kontroll, glicin- és KCl-kezelt idegsejtek dendrittüskéiről. A színskálán a különböző árnyalatok mutatják a relatív PKD aktivitást, a hideg színek az alacsony aktivitást, a meleg színek a magasabb aktivitást mutatják. A nyílhegyek a gomba morfológiájú tüskékre mutatnak. Mércé: 1 μ m.

6.2.2. A glicinnel kiváltott kémiai LTP az endogén PKD aktiválódását váltja ki a dendrittűskékben

Ahogy korábbi eredményeink mutatták, a glicinnel kiváltott kémiai LTP során a dendrittűskék feje kiszélesedett. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a dendrittűskék fejének morfológiai változása együtt jár-e a PKD aktivitás megváltozásával. Ehhez a kiültetést követően a 12. napon a sejteket a PKD aktivitás szenzorral transzfektáltuk, a tenyészetekben glicin kezeléssel LTP-t váltottunk ki, majd a PKD aktivitást a dendrittűskékben elemeztük.

Megvizsgáltuk, hogy a glicinnel kiváltott kémiai LTP során használt ECS-ben történő inkubálás után a PKD aktivitás változása kimutatható-e. Ennek vizsgálatára a PKD specifikus gátlószerét, a kbNB 142-70-et alkalmaztuk (24. és 25. ábra). A kbNB 142-70 jelenlétében a dendrittűskékben csökkent a PKD aktivitás szenzor foszforilációjának mértéke, de ez sem 5, sem 30 perc túlélést követően sem bizonyult szignifikánsnak. Megállapíthatjuk, hogy a glicinnel kiváltott kémiai LTP során használt ECS-ben a PKD aktivitás nem mutatható ki.

A hippocampális idegsejt-tenyészetekben a glicin kezelés után, 5 és 30 perc túlélést követően közel háromszorosára emelkedett a PKD aktivitás (24. ábra). Ha a glicin kezelés mellett a PKD-ra specifikus gátlószer, a kbNB 142-70-et is alkalmaztuk, a PKD aktivitása mindkettő túlélési időpontban szignifikánsan csökkent. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a glicinnel kiváltott *in vitro* LTP esetén a PKD aktiválódik a dendrittűskékben. Kimutattuk, hogy az NMDA-receptorok aktiválódása is hozzájárul a PKD aktivitás növekedéséhez. Modellrendszerünkben ezt glicin jelenlétében APV adagolással (NMDA-receptorok kompetitív antagonistája) is igazoltuk. Ebben az esetben a PKD aktivitás fokozódását nem láttuk, ami azt jelzi, hogy a PKD aktiválódását az NMDA-receptorok működése irányítja.



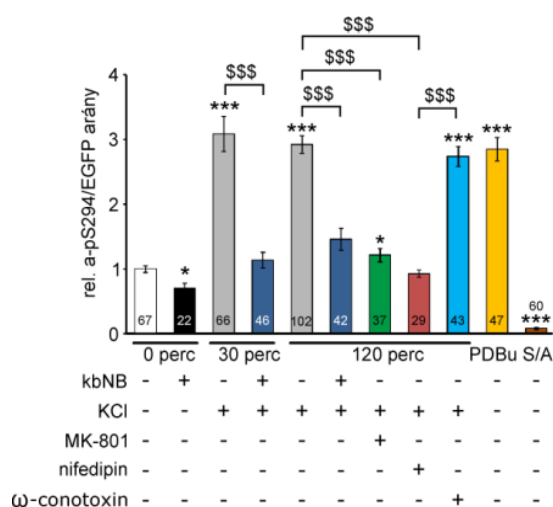
25. ábra Relatív a-pS294/EGFP arány értékek a gomba morfológiájú dendrittűskékben glicinnel kiváltott LTP után. A kapott intenzitás értékeket a 30 perc túlélés után fixált, kontroll értékre viszonyítottuk. A kbNB 142-70-et (kbNB), a glicint és az APV-t a jelzett időpontokban és kezeléseket alkalmaztuk. S/A: PKD aktivitás szenzor mutáns, amely nem foszforilálható alanint tartalmaz. A túlélési idők a grafikon alján szerepelnek. Az adatok 3-4 független tenyészetből származnak, az elemszámok az oszlopokban olvashatóak. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. A * mutatja a szignifikanciát a kontrollhoz viszonyítva, a \$ mutatja más értékhez viszonyított szignifikancia szintet. **: $p < 0,01$; *** vagy \$\$\$: $p < 0,001$.

6.2.3. A KCl okozta tartós depolarizáció során is aktiválódik az endogén PKD a dendrittüskékben

A KCl okozta tartós depolarizáció hatására a dendrittüskék feje kiszélesedett. Arra kerestük a választ, hogy a rövidebb idejű, 30 és 120 perces KCl kezelések alatt a dendrittüskékben a PKD aktivitás változása megfigyelhető-e. Ennek tisztázására a kiültetést követő 12. napon a sejteket a PKD aktivitás szenzorral transzfektáltuk és azt vizsgáltuk, hogy a PKD aktivitás hogyan változik a rövid idejű KCl kezelés hatására a dendrittüskékben.

Ha a tápfolyadékban a KCl szintjét 20 mM-lal megemeltük, akkor 30 és 120 perc túlélést követően is szignifikánsan megnőtt a PKD aktivitása (**24. ábra és 26. ábra**). A PKD-t közvetve aktiváló KCl hatása a dendrittüskékben legalább 2 órán keresztül fennmaradt, amely hasonló értéket mutatott, mint a PDBu¹¹ alkalmazása során mért PKD aktivitás (**26. ábra**). A KCl-dal kiváltott PKD aktivitás-növekedést a kbNB 142-70 a 30 és a 120 perc túlélési idő után is megakadályozta. Az egyelőre nem teljesen tisztázott, hogy a KCl kezelés milyen mechanizmusokon keresztül okozza a PKD aktivitás növekedését, de valószínűsíthető, hogy a folyamatban az NMDA-receptorok is érintettek, mivel az MK-801 (az NMDA-receptorok nem-kompetitív antagonistája) jelenlétében szignifikánsan csökkent a PKD aktivitása a KCl-dal kezelt sejtek aktivitás értékeihez viszonyítva (**26. ábra**). Ez azt bizonyítja, hogy a PKD aktivitását az NMDA-receptorok aktiválódása befolyásolja.

A tartós KCl kezelés a sejtek homeosztatikus plaszticitásának megváltozását okozza (Grubb és Burrone, 2010). Ismert, hogy a folyamatban a feszültségfüggő kalcium csatornák nyitására megemelkedő intracelluláris



26. ábra Relatív a-pS294/EGFP arány értékek a gomba morfológiájú dendrittüskékben KCl kezeléssel kiváltott tartós depolarizáció után. A kapott intenzitás értékeket a 30 perces inkubációs idejű kontroll értékhez (20 mM NaCl kezelést alkalmaztunk) viszonyítottuk. A kbNB 142-70-et (kbNB), a KCl-et, az MK-801-et, a nifedipint, az ω-conotoxint és a PDBu-t a jelzett időpontokban és kezeléseken alkalmaztuk. S/A: PKD aktivitás szenzor mutáns, amely nem foszforilálható alanint tartalmaz. A túlélési idők a grafikon alján szerepelnek. Az adatok 3-4 független tenyészetből származnak, az elemszámok az oszlopokban olvashatóak. Az adatok az átlag ± SEM értékeket mutatják. A * mutatja a szignifikanciát a kontrollhoz viszonyítva, a \$ mutatja más értékhez viszonyított szignifikancia szintet. *: p<0,05; *** vagy \$\$\$: p<0,001.

¹¹ A PDBu a forbol-észterek családjába tartozó vegyület, amely a PKC és PKD aktiválására képes.

kalciumion szint is szerepet játszik. Ennek bizonyítására kalcium csatorna blokkolók hatását vizsgáltuk KCl adása mellett. A nifedipin (T- és L-típusú kalcium csatornákat blokkoló) KCl jelenlétében jelentősen csökkentette a PKD aktivitását, a P/Q- és N-típusú kalcium csatorna blokkoló ω -conotoxin MVII C esetében viszont ez nem történt meg.

Eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy a KCl kezelés során az endogén PKD aktiválódik. Az aktiváció legalább két óráig fennmarad, a PKD-specifikus gátlószerekkel a hatás gátlható. A deloparizáció hatására a T- és L-típusú kalcium csatornákon keresztül megemelkedő intracelluláris kalciumion szint, illetve az NMDA-receptorok nyitása is hozzájárul a PKD-dependens útvonalak aktivációjához.

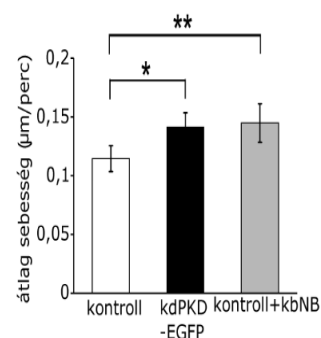
6.3. A PKD szabályozza az aktin vázrendszer dinamikáját a dendrittüskékben

6.3.1. A PKD aktivitás gátlása növeli a dendritikus filopódiumok *in vitro* motilitását

Az élő idegsejtek nyúlványairól készült mikroszkópos felvételek alkalmasak a dendritikus filopódiumok megfigyelésére a tenyészetben. Kutatócsoportunk vizsgálni kívánta, hogy a PKD aktivitás megváltoztatása hogyan hat a dendritikus filopódiumok motilitására.

A dendritikus protrúziók motilitását DIV10-12 korú tenyésztett hippocampális idegsejtenyészeteken vizsgáltuk live cell imaging technika segítségével. A felvételeket a kutatócsoportunkban kifejlesztett NIH ImageJ/Fiji keretrendszerben működő DFMA (Dendritic Filopodia Motility Analyzer) alkalmazás segítségével elemeztük (Tárnok és mtsai., 2015)¹². A plugin elsősorban a mozgékony dendritikus filopódiumok elemzésére alkalmas.

Az elemzés során a mozgékonyság egyik jellemző paraméterét, a dendritikus filopódiumok tömegközéppontjának átlagos elmozdulását vizsgáltuk. Kontrollként az üres vektorral transzfektált sejteket választottuk. A PKD aktivitás gátlását a domináns-negatív fenotípust mutató PKD mutáns (kdPKD-EGFP) transzfektálásával és a PKD specifikus



27. ábra A dendrittüskék tömegközéppontjának átlagos elmozdulása EGFP-t termelő (kontroll), egy PKD specifikus gátlószerekkel, a kbNB 142-70 (kbNB) jelenlétében, illetve kdPKD-EGFP-t termelő sejtekben. Az adatok 2 független tenyészetből származnak. A méréshez 18 kontroll, 21 kdPKD-EGFP és 13 kbNB kezelt tüskét elemeztünk. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

¹² Az alkalmazás kifejlesztését és validálását a közleményben leírtuk, az Eredmények 6.8.2. fejezetében a kiértékelés menetét részletesen ismertetem.

gátlószer adásával (kbNB 142-70) is vizsgáltuk. Eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy a dendritikus filopódiumok motilitása mindkét esetben szignifikánsan megnőtt (**27. ábra**).

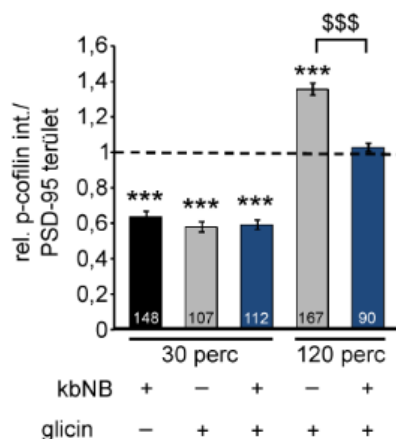
6.3.2. A dendrittüskékben az aktin vázrendszer dinamikájának egyik meghatározója az ADF/cofilin foszforiláltsági szintje

A cofilin 3. pozíciójú szerinjének (Ser3) foszforiláltsági szintje összefügg az aktin vázrendszer átalakulását befolyásoló cofilin aktivitással. A Ser3 foszforilációja a filamentáris aktin stabilizációjához vezet, defoszforilációja pedig az aktin vázrendszer destabilizálódását okozza (Mizuno, 2013). A glicinnel kiváltott kémiai LTP, valamint a KCl által kiváltott tartós depolarizáció a dendrittüskék morfológiai változását okozza, amihez az aktin vázrendszer gyors átépülése is szükséges. Kutatócsoportunk azt vizsgálta, hogy a dendrittüskék fejében bekövetkező PKD aktiválódás a cofilin-dependens útvonalon keresztül fejt-e ki szabályozó hatást. A foszforilált Ser3-cofilin szintet kvantitatív mikroszkópos módszerekkel elemeztük a dendrittüskék fejében. A PSD-95 a dendrittüskék feji részében nagy mennyiségben megtalálható fehérje, amelynek kiterjedése jól korrelál a dendrittüskék fejének alakjával, így a tüske fejekben zajló cofilin aktivitást a PSD-95 immunpozitivitást mutató területeken belül elemeztük.

6.3.3. A dendrittüskékben az aktin vázrendszer átépülése a glicinnel kiváltott kémiai LTP során megváltozik

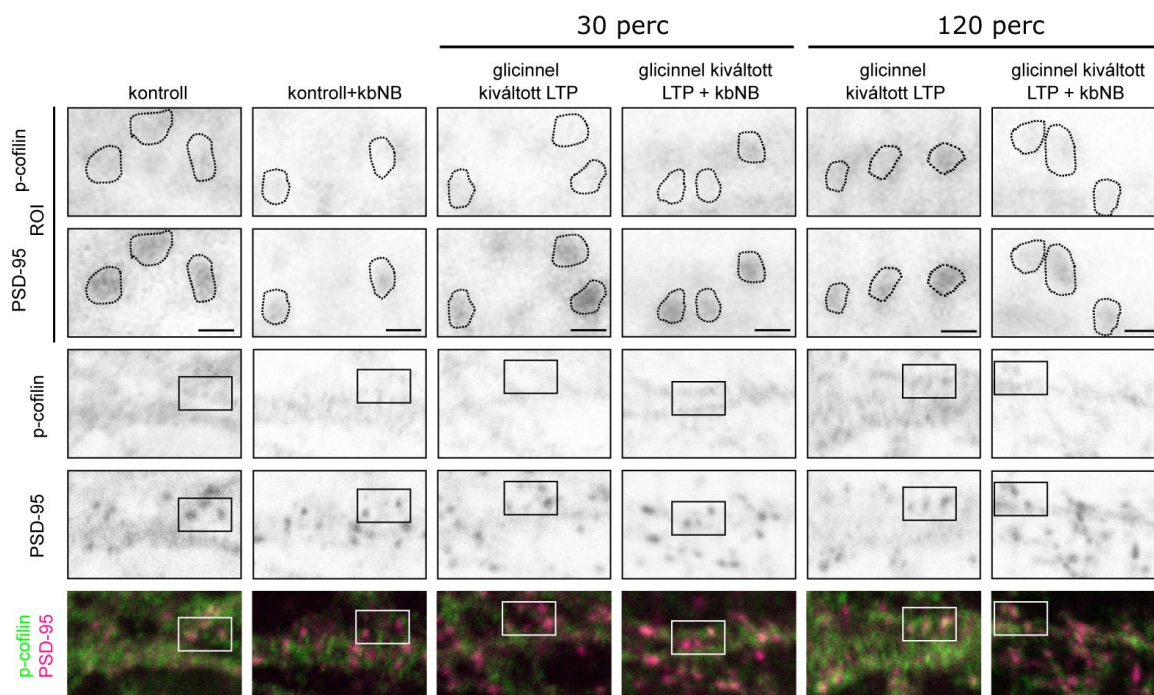
DIV12-13 korú hippocampális idegsejtenyészetek dendrittüskéinek a fejében vizsgáltuk a foszforilált cofilin intenzitás értékeit a (**28. ábra** és **29. ábra**). A glicinnel kiváltott indukció utáni 30. percben fixált dendrittüskék fejében a foszforilált cofilin szint lecsökkent, ami összhangban áll azzal, hogy ebben az időintervallumban az F-aktin rendszer a dinamikus reorganizáció állapotában van (ún. korai LTP; Bosch és mtsai., 2014). Ehhez hasonló hatást láttunk a kbNB 142-70 alkalmazása során is. Amennyiben a glicinnel kiváltott LTP során kbNB

142-70-et is alkalmaztunk, a hatás nem volt additív, vagyis a GI-LTP-vel kiváltott, tranzien



28. ábra PSD-95 területre vonatkoztatott, relatív foszforilált Ser3-cofilin intenzitás változása a dendrittüskékben. A kezeléseket a 30 perc inkubálási idő után fixált, kezeletlen értékekhez viszonyítottuk (szaggatott vonal). A túlélési idők a grafikon alján szerepelnek. A kbNB 142-70-et (kbNB) és a glicint a jelzett időpontokban és kezeléseket alkalmaztuk. Az adatok 3-4 független tenyészetből származnak, az elemszámok az oszlopokban olvashatóak. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. A * a kontrollhoz, a \$ pedig a jelzett értékekhez viszonyított szignifikáns eltérést mutatja. *** vagy \$\$\$: $p < 0,001$.

cofilin aktivitást a PKD gátlása nem volt képes tovább növelni. A glicin kezelést követő 120. percben fixált dendrittűskékben a foszforilált cofilin szintje ezzel szemben szignifikánsan megnőtt. Mindez összhangban van azzal, hogy ekkor már a kezdeti dinamikus átrendeződés fázisa lezajlott és az aktin vázrendszer a konszolidáció fázisába került (ún. késői LTP; Bosch és mtsai., 2014). Ebben az időpontban a kbNB 142-70 kezelés szignifikánsan lecsökkentette a foszforilált cofilin szintjét, jelezve, hogy a PKD cofilint inaktiváló hatása a késői LTP alatt már érvényesült.

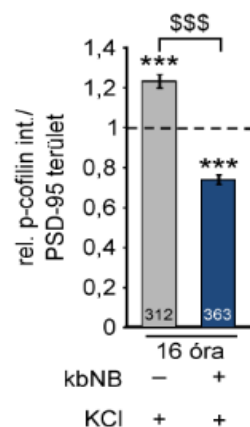


29. ábra Foszforilált cofilin immunfestés a PSD-95 pozitív dendrittűskékben. A felső négy sorban fluoreszcens, invertált képek, alul pedig ezek hamisan színezett és egymásra vetített változatait láthatjuk. A színes képeken a PSD-95 és a foszforilált cofilin kolokalizációja fehér színnel látszik. A felső két sorban a 3-4. sorban bemutatott területek kinagyított részletei látszanak, a szaggatott vonalak a PSD-95 pozitív dendrittűskék fejét jelzik. A szaggatott vonalakon belül a sötétebb színek a magasabb foszforilált cofilin szintet mutatják. A túlélési idők és a különböző kezelések az ábra tetején vannak feltüntetve. Mércse: 1 μ m.

6.3.4. A hosszútávú KCl kezelés hatására bekövetkező cofilin-inaktivációban a PKD aktivitás is szerepet játszik

A tartós KCl kezelés a neuronokon depolarizációs blokkot okoz és csökkenti azok nyugalmi membránpotenciálját (Bencsik és mtsai., 2015 S1/D ábra). Vizsgálni kívántuk, hogy a hosszú idejű KCl kezelés következtében kialakuló tüskefej kiszélesedésben, amelyben az F-aktin vázrendszer is érintett, a PKD-függő hatások érvényesülnek-e. Ennek a kérdésnek a megválaszolására 16 órás KCl kezelés után vizsgáltuk, hogy a PSD-95 területekre viszonyított foszforilált cofilin intenzitás a tenyésztett idegsejtek dendrittüskéiben hogyan változik.

A dendrittüskék PSD-95 pozitív területére vonatkoztatott foszforilált Ser3-cofilin intenzitás értékeit a **30. ábra** mutatja be. 16 órás KCl kezelés hatására a foszforilált cofilin szintje szignifikánsan megnőtt, összhangban azzal, hogy a kiszélesedett tüskefejekben a szétágazó aktin filamentumok már stabilizálódtak. Amennyiben a KCl mellett a PKD specifikus gátlószerét is alkalmaztuk, a foszforilált cofilin szintje szignifikánsan csökkent. Mindezek igazolják, hogy a PKD a plaszticitáshoz szükséges F-aktin stabilizációt a cofilin inaktivációján (Ser3 foszforilációján) keresztül, közvetetten szabályozza.



30. ábra PSD-95 területre vonatkoztatott, relatív foszforilált Ser3-cofilin intenzitás változása a dendrittüskékben. A kbNB 142-70-et (kbNB) és a KCl-et a jelzett időpontokban alkalmaztuk. A 16 órás KCl kezeléseket a 120. percben fixált értékekhez viszonyítottuk (szaggatott vonal). Az adatok 3-4 független tenyészetből származnak, az elemszámok az oszlopokban olvashatóak. Az adatok az átlag ± SEM értékeket mutatják. A * a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést mutatja. *** vagy \$\$\$: $p < 0,001$.

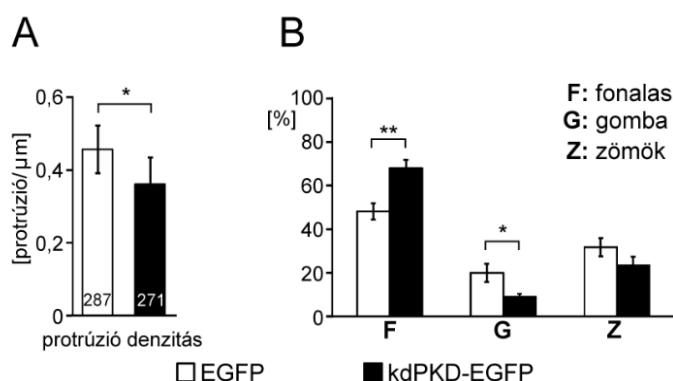
6.4. A PKD aktivitás a dendrittüskék eloszlását és morfológiáját is befolyásolja

6.4.1. A domináns-negatív kdPKD-EGFP mutáns expressziója megváltoztatja a dendrittüskék eloszlását és morfológiáját

A PKD aktivitás szenzorral végzett vizsgálatok egyértelműen bizonyítják, hogy a PKD a dendrittüskék fejének kiszélesedéséhez vezető, glicinnel kiváltott LTP és a KCl-dal kiváltott tartós depolarizáció során is aktiválódik a dendrittüskékben. Megvizsgáltuk, hogy az endogén PKD aktivitásra domináns-negatív hatást kifejtő kdPKD-EGFP túltermeltetése vajon hatással van-e a dendrittüskék eloszlására és morfológiájára. Ennek ellenőrzésére a hippocampális idegsejtenyészeteinket a kiültetést követő 9. napon transzfektáltuk a domináns negatív hatású kdPKD-EGFP-vel, majd egy nap múlva a dendrittüskéken morfometriai elemzéseket végeztünk.

Eredményeink alapján a kiültetést követő 10. napon a tenyésztett neuronok tercier dendritjein a kináz inaktív PKD mutáns túltermeltetése 24 órán belül lecsökkentette a dendritágakon megfigyelhető protrúziók (filopódiumok és dendrittüskék) számát (**31. A ábra**).

A dendrittüskék pontos morfológiai kategorizálását az irodalmi adatok alapján végeztük el (Peters és Kaiserman-Abramof, 1970)¹³. A kdPKD-EGFP konstrukció túltermeltetése jellegzetes változásokat okozott a dendrittüskék eloszlásában és morfológiájában (**32. A, E ábra**): a vékony és hosszúkas (fonalasnak nevezett) dendrittüskék aránya megnőtt, a gomba morfológiájú tüskék gyakorisága pedig lecsökkent. A kis, zömök tüskék aránya hasonló maradt (**31. B ábra**).



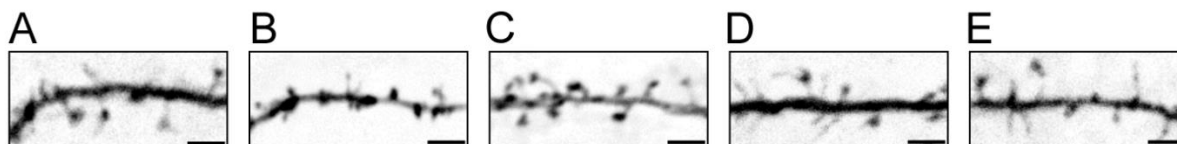
31. ábra A kdPKD-EGFP mutáns megváltoztatja a tercier ágakon a dendrittüskék eloszlását és morfológiáját. **(A)** Egységnyi mikronra vonatkoztatott protrúziók száma. **(B)** A fonalas (F), gomba (G) és zömök (Z) morfológiájú dendrittüskék aránya a kontroll (EGFP-vel) és a kdPKD-EGFP-vel transzfektált hippocampális tenyészetekben. Az adatok 3 független tenyészetből származnak. Az A panelen feltüntetett elemszámok a B panelra is érvényesek. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Megvizsgáltuk, hogy a PKD aktivitás kémiai gátlása a dendrittüskék morfometriai paramétereiben okoz-e különbséget. Ehhez az egyedi dendrittüskék morfológiai adatait a fejszélesség/nyakszélesség (HN-index) és a hosszúság paraméterek függvényében ábrázoltuk

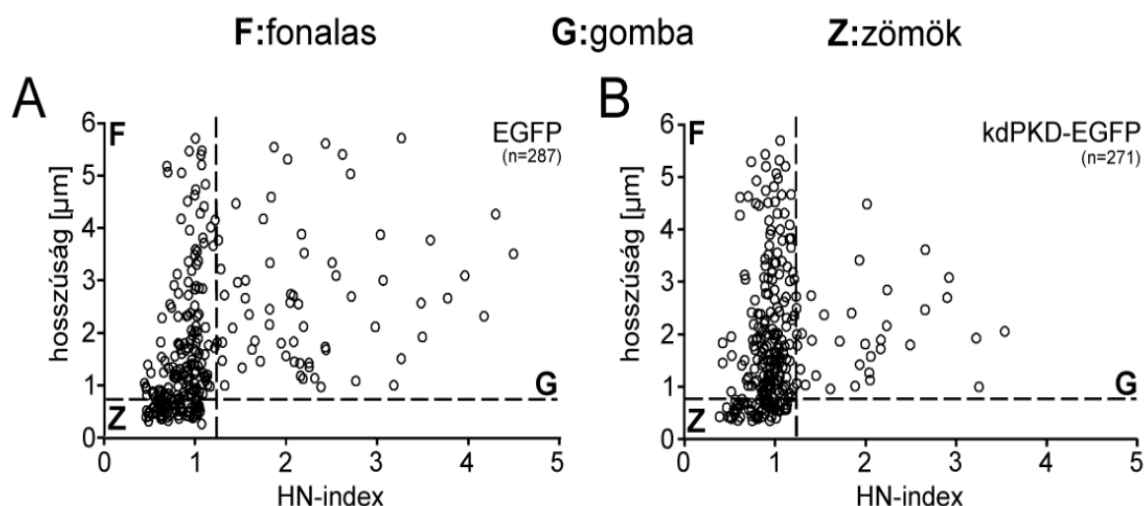
¹³ A morfológiai elemzés háttérét részletesen az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetem.

(33. ábra). A kontroll csoportban a fonalas és gomba morfológiájú dendrittűskék feje szélesebb volt, a gomba morfológiájú dendrittűskék pedig hosszabbnak bizonyultak, mint a kdPKD-EGFP-vel transzfektált sejtekben (Mann-Whitney U-teszt, $p < 0,01$ és $p < 0,05$). A kis, zömök tűskék méreteiben nem találtunk jelentős különbséget.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a PKD aktivitás gátlása a protrúziók denzitását és a gomba morfológiájú dendrittűskék mennyiségét a tenyésztett idegsejtekben lecsökkenti.



32. ábra Fluoreszcens, invertált képek DIV12-13 korú tercier dendritágakról. (A) Üres EGFP vektorral transzfektált (kontroll), (B) kbNB 142-70-nel kezelt, (C) KCl-dal kezelt, (D) kbNB 142-70-nel és KCl-dal kezelt, illetve (E) kdPKD-EGFP-vel transzfektált konstrukciók. Mércse: 2 μ m.



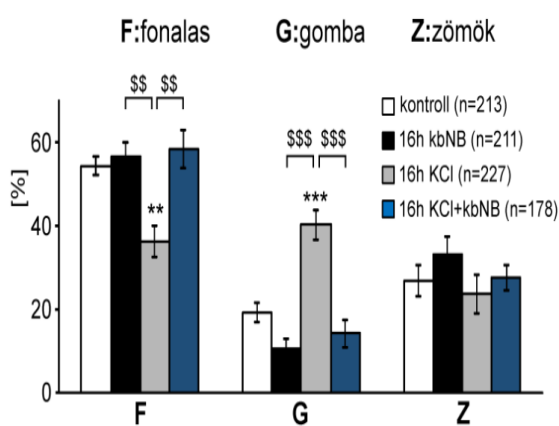
33. ábra A kdPKD-EGFP termelésének hatása a dendrittűskék egyedi paramétereire. (A) kontroll, üres EGFP vektorral, illetve (B) kináz-inaktív kdPKD-EGFP mutánsal transzfektált tenyészetekben. A kvadránsokat, amelyekben az azonos típusba sorolt dendrittűskék szerepelnek, szaggatott vonalak választják el egymástól. Az adatok 3 független tenyészetből származnak, a jobb felső sarokban az elemszámok olvashatóak.

6.4.2. A tartós depolarizáció hatására a dendrittüskék feje PKD-függő módon szélesedik ki

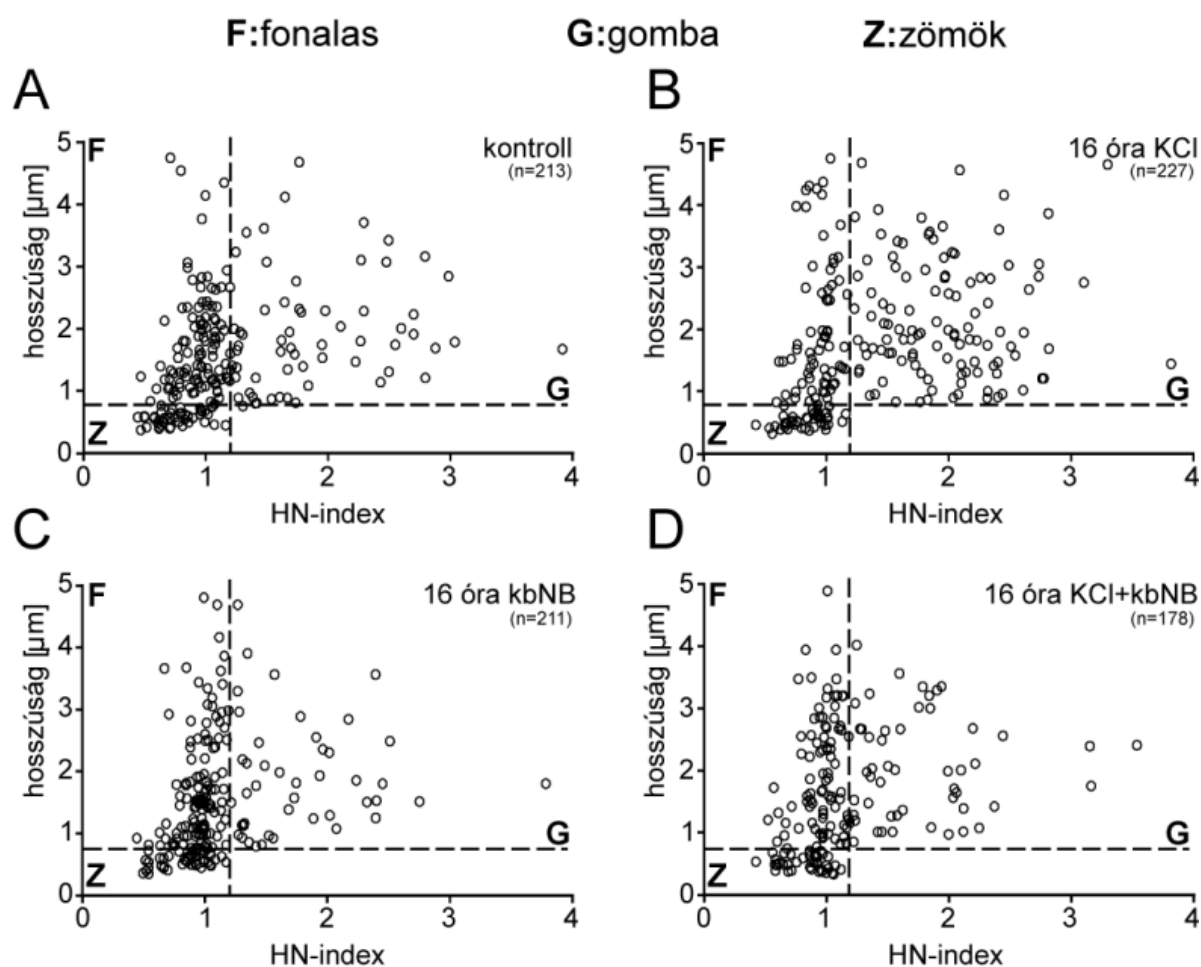
A PKD aktivitás szenzorral végzett kísérletek bizonyítják, hogy a KCl kezelés során a PKD a dendrittüskékben aktiválódik. Megvizsgáltuk, hogy a PKD aktivitás a dendrittüskék fejének tartós depolarizációval kiváltott kiszélesedésében szerepet játszik-e. Ehhez a hippocampális idegsejttenyészeteket a kiültetést követő 9. napon üres vektorral (EGFP) transzfektáltuk, majd a kbNB 142-70 és a KCl kezelések következtében a dendrittüskék paramétereiben bekövetkező morfológiai változásokat kvantitatívan elemeztük.

A hippocampális idegsejttenyészetekben a kiültetést követő 10. napon a tüskedenzitásban nem tapasztaltunk különbséget egyik kezelés típus esetében sem (nincs bemutatva). A tartós, 16 órás KCl kezelés szignifikánsan megnövelte a gomba alakú tüskék arányát, míg a fonalas tüskék aránya lecsökkent (**32. C ábra és 34. ábra**). A kbNB 142-70 jelenléte a gomba morfológiájú tüskék arányát csökkentette (**32. B ábra**), de ez szignifikánsan nem különbözött a kontroll gomba morfológiájú dendrittüskék százalékos eloszlásától. A tartós depolarizáció okozta tüskefej-kiszélesedést viszont a PKD-sepcifikus gátlószer (kbNB 142-70) alkalmazása megakadályozta (**32. D és 34. ábra**). A kis, zömök morfológiájú dendrittüskék aránya a kezelt csoportok között nem mutatott különbséget. A dendrittüskék morfológiai jellemzése tekintetében nem találtunk szignifikáns különbségeket a dendrittüskék között (**35. ábra**).

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a dendrittüske fejek a tartós depolarizáció következtében kialakuló kiszélesedésében a PKD szerepet játszik.



34. ábra A kbNB 142-70 (kbNB) és/vagy a tartós depolarizáció megváltoztatja a terciér dendritágakon a dendrittüskék eloszlását és morfológiáját. A fonalas (F), a gomba (G) és a zömök (Z) morfológiájú dendrittüskék aránya a tenyészetekben. Az adatok 3 független tenyészetből származnak, az elemszámok a grafikon jobb felső sarkában olvashatók. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. A * mutatja a szignifikanciát a kontrollhoz viszonyítva, a \$ mutatja a szignifikanciát a kontrollhoz viszonyított szignifikancia szintet. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vagy \$\$: $p < 0,01$. \$\$\$: $p < 0,001$.



35. ábra A tartós depolarizáció (KCl) és a PKD-specifikus gátlószer, a kbNB 142-70 (kbNB) hatása a dendrittüskék egyedi paramétereire. **(A)** Kontroll, **(B)** tartós depolarizáció, **(C)** 16 óra kbNB 142-70 és **(D)** tartós depolarizáció és kbNB 142-70 együttes hatása a dendrittüske morfológiára. A kvadránsokat, amelyekben az azonos típusba sorolt dendrittüskék szerepelnek, szaggatott vonalak választják el egymástól. Az adatok 3 független tenyészetből származnak, a jobb felső sarokban az elemszámok olvashatóak.

6.5. A hippocampusban termelődő domináns-negatív kdPKD-EGFP mutáns fehérje a CA1 és CA3 régióban is befolyásolja a dendrittüskék morfológiáját

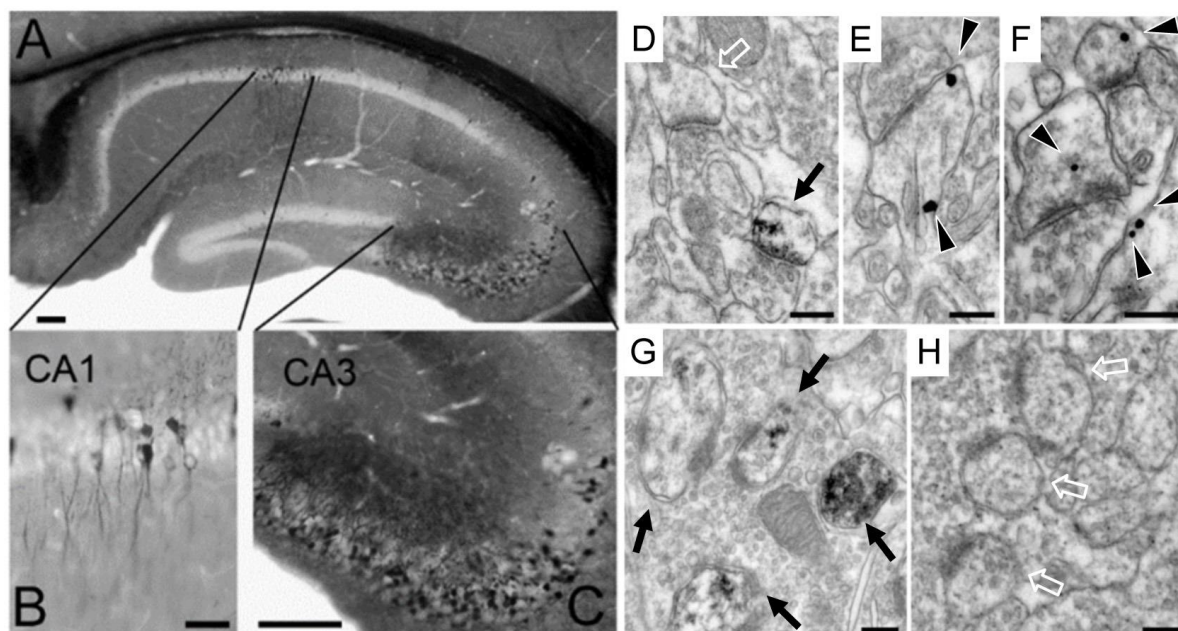
A tenyésztett idegsejteken elvégzett kísérleteink bizonyították, hogy a PKD az aktin vázrendszerre gyakorolt szabályozó hatásán keresztül regulálja a dendrittüskék aktivitásfüggő morfológiai átalakulását. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az *in vitro* megfigyelt hatás vajon *in vivo*, az élő állatok agyszövetében is kimutatható-e. Ehhez a hippocampusban domináns-negatív fenotípust eredményező kdPKD-EGFP fehérjét két egértörzs [a CaMKII α -rtTAII-t heterozigóta formában hordozó (Michalon és mtsai., 2005), illetve a kdPKD-EGFP-t homozigóta formában hordozó egerek (Czöndör és mtsai., 2009)] egyedeinek pároztatásából született kettős transzgén (CaMKII α -rtTAII x kdPKD-EGFP) egerekben vizsgáltuk. A szövetspecifikus expressziót a kettős transzgén állatokban doxiciklin adásával indukáltuk. Az egyszeres transzgén állatok alkották a kontroll csoportot, amelyek szintén kaptak doxiciklin kezelést.

A kettős transzgén egerek hippocampusában 10-12 hét doxiciklin kezelés után vizsgáltuk, hogy *in vivo* milyen hatással van a PKD aktivitás gátlása. Ehhez Rác Bencével, a Szent István Egyetem Állat-örvostudományi Karának munkatársával együttműködve elemeztük a hippocampus CA1 és CA3 régiójának dendrittüske profiljait. Az elektronmikroszkópos felvételek készítését és elemzését Rác Bence végezte.

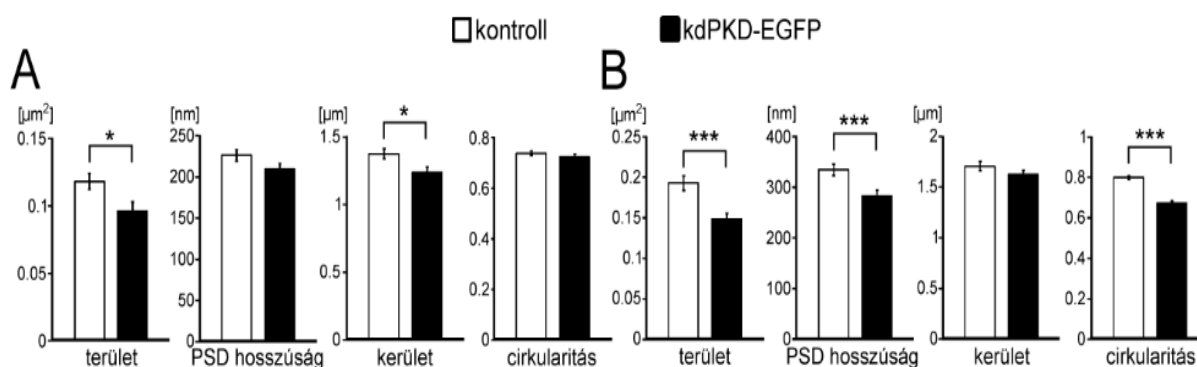
A fénymikroszkópos felvételeken látható (**36 A-C ábra**), hogy a doxiciklinnel kezelt, kettős transzgén állatok hippocampusának CA1 és a CA3 régióiban is detektálható a mutáns PKD¹⁴. A nagyagykéreg piramisneuronjaiban csak minimális expressziót tapasztaltunk (nincs bemutatva). A kontroll (doxiciklinnel kezelt, egyszeres transzgén) állatok esetében a-GFP immunpozitivást nem figyeltünk meg (**36. E ábra**). A hippocampus CA1 régiójában a stratum radiatum, a CA3 régióban pedig a stratum lucidum réteg dendrittüske profiljain végeztük az elemzést. A hippocampus CA1 régió stratum radiatumában a kdPKD-EGFP-t expresszáló állatok dendrittüske profiljainak területe és kerülete szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll állatokéhoz képest (**37. A ábra**). A PSD hosszúságban és a cirkularitásban szignifikáns különbséget nem találtunk. A gyrus dentatus szemcsesejtjeinek moharostjai a CA3 régió stratum lucidumában alkotnak szinapszist. A kettős transzgén állatok dendrittüske profiljainak területe, PSD hosszúsága és cirkularitása ebben a régióban szignifikánsan csökkent a kontroll állatok értékeihez viszonyítva (**37. B ábra**).

¹⁴ A kereskedelmi forgalomban nem kapható olyan specifikus ellenanyag, amellyel a PKD-t ki lehetne mutatni immuncitokémiai és elektronmikroszkópos detektálással. Ezért a GFP jel alapján vizsgáltuk a mutáns fehérje jelenlétét.

Ismert adat, hogy a kisebb szinaptikus felszínnel rendelkező tüskékben csökken a szinaptikus transzmisszió hatékonysága, amely hatással van a neuronális hálózatokra (Hung és mtsai., 2008). Ennek tükrében vizsgálni kívántuk, hogy a PKD aktivitás gátlása milyen hatással van az állati viselkedésre.



36. ábra A domináns negatív kdPKD-EGFP a hippocampusban expresszálódik doxiciklin kezelés hatására. A fénymikroszkóppal készített felvételeken az anti-GFP immunfestést a hippocampus területén (A), a CA1 régióban (B) és a CA3 régióban láthatjuk (C). Az elektronmikroszkóppal készített felvételeken a kdPKD-EGFP-t expresszáló idegsejteket a CA1 régióban a (D-F) paneleken, a CA3 régióban a G paneleken láthatjuk. Az egyszeres transzgén egerek hippocampusából (CA3 régió) készült fotó az (H) paneleken látható. A fekete nyilak anti-GFP-DAB csapadékokra mutatnak. Az immunarany anti-GFP jelölés nyílhegyekkel jelölve látható. A fehér nyilak a nem jelölt tüskéket mutatják. Mércé: 100 μm (A, C), 50 μm (B), 200 nm (D-H).



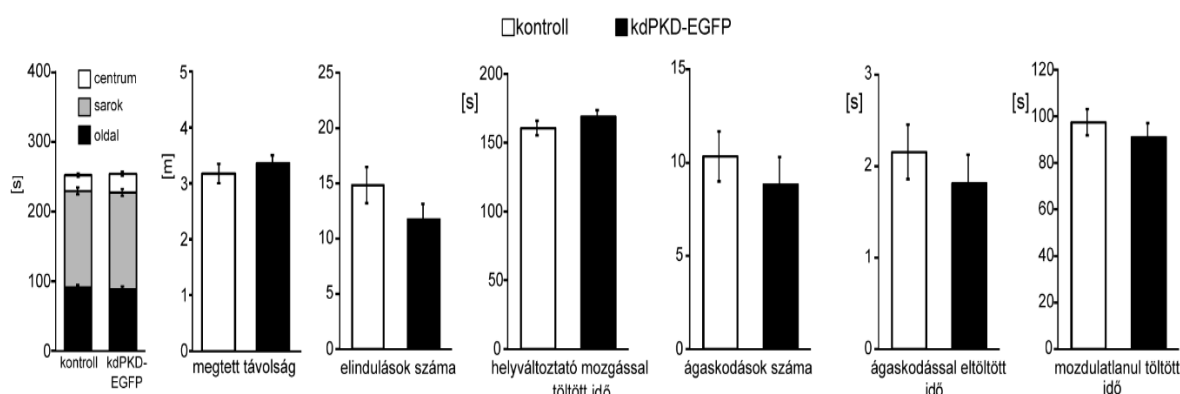
37. ábra A domináns negatív kdPKD-EGFP expressziója a dendrittüskék morfológiáját megváltoztatja *in vivo*. 10-12 hét doxiciklin kezelés után a kettős transzgén állatok hippocampusának CA1 (A) régiójában szignifikánsan csökkent a dendrittüskék területe és kerülete. 3-3 kontroll és kettős transzgén állat, 114 és 144 dendrittüske profiljait elemeztük. A kettős transzgén állatok hippocampusának CA3 régiójában (B) a dendrittüskék területe, PSD hosszúsága és cirkularitása is szignifikánsan csökkent. 3-3 kontroll és kettős transzgén állat, 142 és 153 dendrittüske profiljait elemeztük. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

6.6. A hippocampusban expresszáldó domináns-negatív PKD hatása az állati viselkedésre

6.6.1. A hippocampusban expresszáldó kdPKD-EGFP nem befolyásolja az egerek általános mozgásmintázatát

A nyílt porond teszt a viselkedés-élettani vizsgálatokban használt spontán viselkedést vizsgáló eljárás, amelynek segítségével az állatok motoros működését és explorációs tevékenységét vizsgálják (Prut és Belzung, 2003). Öt hét doxiciklin kezelés után vizsgáltuk, hogy a kettős transzgén állatok hogyan teljesítettek ebben a tesztben.

A vizsgálat öt perce alatt a hely-preferenciában nem volt különbség a két állatcsoport között, közel ugyanannyi időt töltöttek az állatok a centrumban, a sarkokban, illetve a porond széli részein (**38. ábra**). A doxiciklinnel kezelt, kettős transzgén és a kontroll állatok értékei között a hely-preferencia mellett a további paraméterekben (megtett távolság, elindulások száma, helyváltoztató mozgással töltött idő, ágaskodással töltött idő, ágaskodások száma, mozdulatlanul töltött idő) sem találtunk eltérést (**38. ábra**).

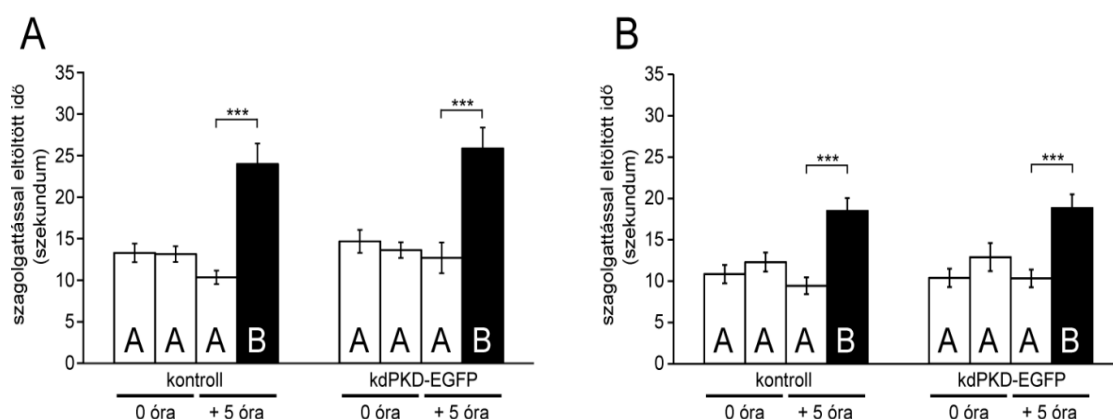


38. ábra A nyílt porond tesztben a hely-preferenciában, a megtett távolságban, az elindulások számában, a helyváltoztató mozgással töltött időben, az ágaskodással töltött időben, az ágaskodások számában és a mozdulatlanul töltött időben sem találtunk különbséget a két állatcsoport között. A tesztben csoportonként 16-16 állat vett részt. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják.

6.6.2. A hippocampusban expresszáldó kdPKD-EGFP az új objektum felismerés tesztben nincs hatással az egerek új tárgy felismerési képességére

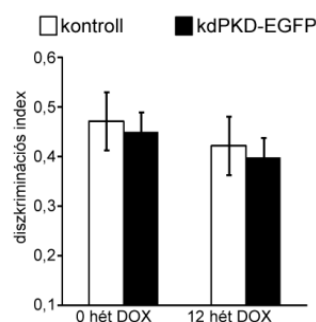
A rágsálók vizuális objektum felismerési memóriájának egyik elfogadott vizsgálati módszere az új objektum felismerés teszt. Az új tárgyak felismerésében alapvető szerepet játszanak a temporális lebeny parahippokampális régiójának struktúrái (perirhinális kéreg, entorhinális kéreg és az inferior temporális kéreg) (Hammond és mtsai., 2004). Ezeken az agyterületeken a kdPKD-EGFP expressziója nem jelentős (nincs bemutatva). A teszteket két időpontban is elvégeztük, a doxiciklines kezelés előtt, valamint 12 héttel később, amikor a kináz inaktív kdPKD-EGFP a hippocampusban már jelentős mennyiségben termelődött.

Az akvizíció alatt a két állatcsoport mindkét vizsgált időpontban ugyanannyi időt töltött az objektumok explorálásával (**39. ábra**). Az új tárgy felismerését mérő teszt (ún. retenció mérés) öt órával az akvizíció után történt, amikor az új tárgy szimatolásával eltöltött idő a kontroll és a PKD mutáns állatok esetében is szignifikánsan több volt a már ismert tárgyhöz viszonyítva. Az új tárgyak szimatolásával hozzávetőlegesen ugyanannyi időt töltöttek az állatok mindkét csoportban.



39. ábra Az állatok új tárgy felismerési képessége a doxiciklin kezelés előtt (**A**) és 12 héttel később (**B**). Az „A” és „B” jelzés a tárgyakat jelzik, amelyből a „B” jelenti az új objektumot. A tesztben 16-16 állat vett részt csoportonként. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. ***: $p < 0,001$.

Meghatároztuk az új objektum szagoltságára vonatkoztatott relatív értéket, a diszkriminációs indexet is (**40. ábra**), ami a két csoport között a vizsgált időpontokban nem különbözött. Ebből megállapíthatjuk, hogy a hippocampusban túltermeltetett kináz-inaktív PKD mutáns az új tárgyak felismerésére nincs hatással.



40. ábra A kettős transzgén állatok új tárgy felismerési képessége nem romlott. A tesztben 16-16 állat vett részt. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják.

6.6.3. A hippocampusban expresszáldó kdPKD-EGFP a hippocampus-dependens térbeli tanulási képességet és a memóriát jelentősen rontja

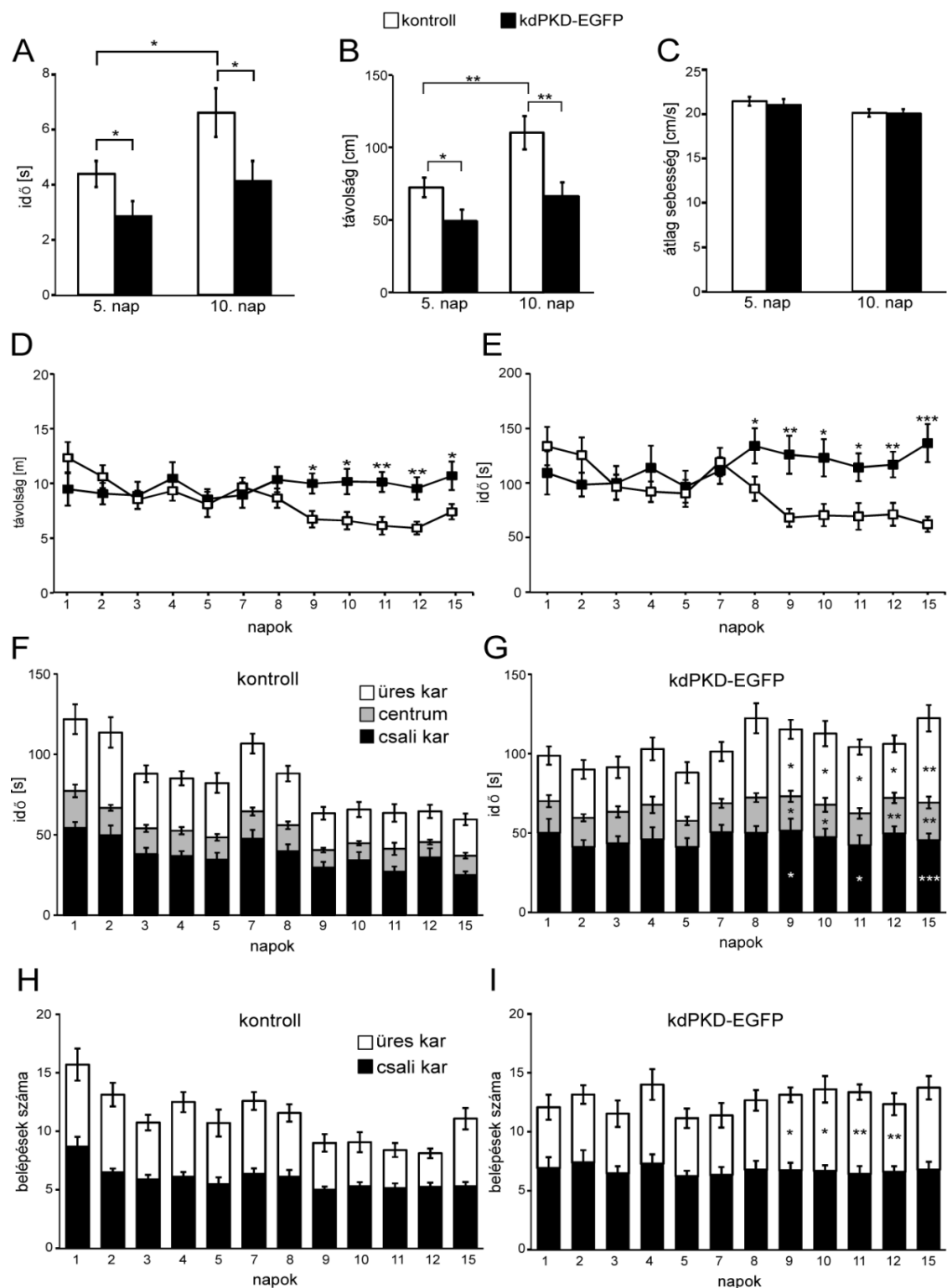
A hippocampusfüggő térbeli tanulást vizsgáló labirintus teszteknel az állatok tanulási/tájékozódási képességeit tesztelik (Chen és mtsai., 2000; Gellért és mtsai., 2012). A kutatócsoportunk két klasszikus labirintus teszt végrehajtásával vizsgálta meg az állatok térbeli tájékozódását. A felvételeket a kutatócsoportunkban kifejlesztett NIH ImageJ/Fiji keretrendszerben működő AnimalTracker alkalmazás segítségével elemeztük (Gulyás és mtsai., 2016)¹⁵.

A Morris-féle vízi labirintus tesztben az állatoknak egy kerek medencében kell megtalálniuk a vízfelszín alatti szigetet. A Morris-féle vízi labirintus tesztet a doxiciklin kezelés kezdetétől számítva a kilencedik héttől hajtottuk végre. A két állatcsoport úszási sebessége között nem találtunk különbséget (kontroll állatok esetében $21,4 \pm 0,91$ cm/s, a kettős transzgén állatoknál $20,97 \pm 0,87$ cm/s volt az átlagsebesség). Az ötödik napon az aznapi 4 tréning után a szigetet kivettük és azt vizsgáltuk, hogy az egerek 30 másodperc alatt mennyi időt és mennyi utat tettek meg a sziget eredeti helyszíne felett. A kontroll állatok az ötödik napon a sziget keresése során szignifikánsan több időt és több utat tettek meg a célterületen, mint a kettős transzgén egerek (**41. A, B ábra**). A kontroll állatok a kettős transzgénekhez viszonyítva a tizedik napon is többet tartózkodtak a célterület felett. Fontos adat az is, hogy a kontroll állatok a mérés ötödik és tizedik napja között szignifikánsan javították eredményüket, míg a kettős transzgén egerek teljesítménye nem változott (**41. C ábra**).

A sugárlabirintus tesztben az egereknek egy 8-karú objektumban kell megtalálniuk a minden második karban elhelyezett csali falatokat. A teszt során mértük a csali falatok megtalálásához szükséges időt és a megtett utat, valamint a karokban eltöltött időt és a belépések számát is. A sugárlabirintus tesztet a doxiciklin kezelés kezdetétől számítva a tizenhatodik héttől hajtottuk végre, a két állatcsoport átlagsebességében nem találtunk különbséget (a kontroll állatok esetében $12,4 \pm 0,55$ cm/s, a kettős transzgén állatoknál $11,5 \pm 0,77$ cm/s volt az átlagsebesség). Az első hét nap után az állatcsoportok között sem a labirintusban megtett útból, sem a labirintusban eltöltött időben nem találtunk különbséget. A második hét elejétől azonban a kontroll állatok szignifikánsan gyorsabban megtalálták a karok végén a morzsákat. A tizenötödik napon a különbség tovább nőtt a két állatcsoport között (**41. D, E ábra**). A kontroll csoportban az első naphoz viszonyítva az utolsó napra szignifikánsan gyorsabban megtalálták a karok végén a morzsákat, de a kettős transzgén egerek esetében nem

¹⁵ A szoftver működéséről írt cikkünk a Neuroinformatics folyóiratban jelent meg (Gulyás és mtsai., 2016). A szoftver leírását az Eredmények 6.9.2. fejezetben ismertetem.

tapasztaltunk változást (Dunnet *post-hoc* analízis; $p < 0,01$ és $p > 0,82$). Vizsgáltuk a zónákban (üres kar, centrum, csali kar) eltöltött idő mennyiségét is. Megállapíthatjuk, hogy a 9. naptól a kontroll állatok szignifikánsan kevesebb időt töltöttek a sugárlabirintusban, mert hamarabb megtalálták a csali morzsákat (**41. F-G ábra**). A kettős transzgén egerek üres és csalit tartalmazó karokba történő belépéseinek száma nem csökkent, míg a kontroll egerek a 9. és a 12. nap között szignifikánsan kevesebbszer léptek be az üres karokba (**41. H-I ábra**).



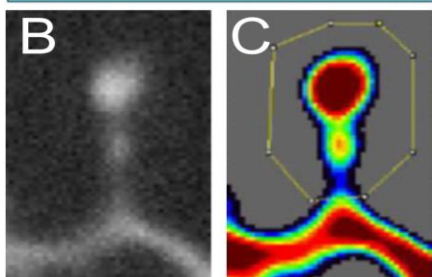
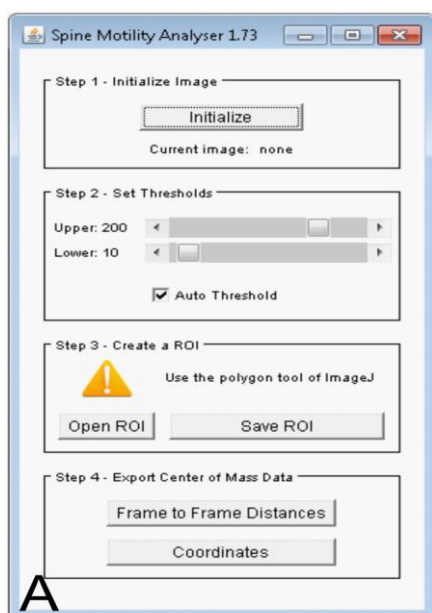
41. ábra A hippocampusz-dependens térbeli tanulási képesség/memória romlik a kdPKD-EGFP-t expresszáló egerekben. A Morris-féle vízi labirintus tesztben a kettős transzgén állatok **(A)** kevesebb időt és **(B)** kisebb távolságot töltöttek az elmozdított sziget felett a mérések 5. és 10. napján, azonos átlagsebesség mellett **(C)**. A sugárlabirintus tesztben a kettős transzgén állatok esetében a **(D)** megtett út és **(E)** eltelt idő nem csökkent a kísérlet alatt. A zónákban **(F-G)** eltöltött idő az egyszeres transzgén állatok esetén szignifikánsan csökkent. A karokba történő belépések száma **(H-I)** az egyszeres transzgén állatok esetében szignifikánsan csökkent. A kísérletekben 16-16 állat vett részt csoportonként. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

6.7. A dendritikus filopódiumok motilitásának elemzéséhez szükséges alkalmazás fejlesztése

6.7.1. A dendritikus filopódiumok/dendrittüskék motilitás meghatározásának háttere

Kutatócsoportunk egy NIH ImageJ/Fiji keretrendszerben működő ingyenes, szemi-automata, a dendritikus filopódiumok/dendrittüskék motilitásának kvantitatív analíziséhez szükséges alkalmazást fejlesztett. A szoftver létrehozásának motivációja az volt, hogy a tudományos közösség számára kevés ingyenes, a rossz jel/zaj arányú fluoreszcens fénymikroszkópos felvételek elemzésére is alkalmas szoftver található. A dolgozat 6.3.1. fejezetében bemutatott adatok kiértékelését a DFMA alkalmazással végezzük. Az alkalmazás közvetlenül elérhető az alábbi linken: <http://cnblab.elte.hu/dfma>.

6.7.2. A DFMA alkalmazás munkafolyamatának bemutatása



42. ábra (A) A DFMA alkalmazás felhasználói panelja. (B) Egy ROI, amely egy dendritikus filopódiumot ábrázol. (C) Hamisan színezett ROI, amelynek pixel értékei a LUT alapján van ábrázolva.

Az alkalmazás Windows és Mac Os X operációs rendszerek alatt fut. Működéséhez szükség van a számítógépünkre telepített NIH ImageJ/Fiji keretrendszerre és Java programozási nyelvre is.

Az alkalmazás 8 bites, szürkeárnyaltos, time-lapse felvételeken képes a kiértékelést végrehajtani (**42. A ábra**). Az elemzés kezdeti lépéseként az elemezni kívánt felvételt be kell töltenünk az NIH ImageJ/Fiji-be. A következő lépésben a dendritágak véletlenszerű, a petri csészék esetleges elmozdulásából adódó mozgását kell kiszűrni, amely hamis tüske motilitás értékeket eredményezne. Ehhez a szintén NIH ImageJ/Fiji környezetben készült StackReg alkalmazást kell használni. Ezt követően a felvételen a felső és alsó intenzitási küszöbértékeket kell úgy beállítanunk, hogy a szaturációs függvény legkisebb súlyai¹⁶ a dendrittüske széli részeire, illetve annak közvetlen környezetébe essenek, míg a legnagyobbak a tüske centrális területein helyezkedjenek el. A kettős küszöbérték használatának a célja, hogy a háttér csak kis súlyokkal szerepeljen, az elemezni kívánt filopódium pedig minél nagyobb

¹⁶ A DFMA alkalmazás a súlyokat az egyes pixelek intenzitás értékeihez rendeli. A kisebb súlyok a sötétebb (háttér; hideg színek) pixeleket, a nagyobb súlyok a világosabb (filopódium; meleg színek) pixeleket jelzik.

X	Y
3.6421457955463117	2.4494335058793912
3.6443628958386944	2.428020577961547
3.652709540606365	2.4172493071302594
3.6506359390024867	2.410902815676887
3.644935200759936	2.431033479928967
3.6478158559021088	2.4164235086067976
3.6593330851230714	2.3665968461518148
3.659469611231392	2.385173179760668
3.6676609391363906	2.362586088122242
3.639792167670608	2.4391605032459496
3.6510724020762897	2.418821762520563
3.652846442438914	2.408061676928102
3.6634134773747236	2.3987305245454884
3.668642324805189	2.401241085152398
3.6748212525636275	2.4170008083090053
3.686632632525741	2.3693871010088707
3.686239582489921	2.371979626401963
3.690404883127258	2.3217672813360157
3.6854517158634414	2.3632705872256716
3.6880447627678445	2.343077511898966
3.6943378330331047	2.2994201628227486
3.7012355960793295	2.2834630558842686
3.7025990718919735	2.2820624815970145
3.6958773371571927	2.2710705247884153
3.7005266733793647	2.2659027665703224
3.6874083063726397	2.3330416719960114
3.6842871329526843	2.29453901678188
3.6872085922457507	2.303060199426838
3.682872629956693	2.303729599613914
3.6877975185345986	2.3025773548189954
3.676785056058098	2.336416128064765
3.6766057951619957	2.3378655663268315
3.679054680650851	2.3422101973578444
3.6763299697389016	2.338706299119387
3.6840417432179686	2.3226544267341973
3.6923064476176357	2.310809594213961
3.6894586894586391	2.308896696651799

43. ábra A DFMA alkalmazásból exportált adattábla. Az „X” és „Y” a dendritikus filopodiumok súlypontjainak a koordinátáit jelentik meg az időben (függőleges sorok).

súlyokat kapjon. A szaturációs függvény a pixelekhez rendelt súlyok alapján számolja ki a kijelölt terület súlypontját. Amennyiben az Auto Threshold ikon aktív, akkor az alkalmazás automatikusan felajánl egy beállítási lehetőséget, amelytől természetesen eltérhetünk. Az eredeti képsorozatunk szürkeárnyalatos pixel értékeihez viszonyítva ekkor egy hamisan színezett képet látunk. Az alkalmazás a szivárvány színeit rendeli a függvény egyes súlyaihoz (rainbow LUT; look-up table) **(42. B és C ábra)**. A következő blokkban lementhetjük a vizsgálni kívánt területet, végül a negyedik blokkban megjeleníthetjük és exportálhatjuk a súlypont elmozdulások távolságát, vagy a súlypontok koordinátáit **(43. ábra)**.

6.8. A viselkedés-élettani vizsgálatok során készített felvételek elemzéséhez szükséges alkalmazás fejlesztése

6.8.1. Az AnimalTracker alkalmazás bemutatása

Kutatócsoportunk egy NIH ImageJ/Fiji keretrendszerben működő ingyenes, szemi-automata és moduláris szerkezetű eszköztárat hozott létre, amellyel az egyéni szempontoknak és elemzési igényeknek megfelelő algoritmusok szabadon kialakíthatóak. Az alkalmazás használható különböző méretű élőlények (hangyák, laboratóriumi rágcsálók, kutyák és emberek) mozgásának követésére és elemzésére is. A szoftver rendelkezik egy hiánypótló sajátossággal is, az NIH ImageJ/Fiji-ben használatos geometriai primitívekből (kör, négyzet, háromszög) logikai műveletekkel a mozgó objektumok számára rendelkezésre álló, tetszőleges zónákat is definiálhatunk. Az Eredmények 6.7.3. fejezetben a sugárlabirintus és a Morris-féle vízi labirintus tesztek felvételeinek elemzéséhez az AnimalTracker szoftvert használtam. A szoftver közvetlenül elérhető az alábbi linken: <http://animaltracker.elte.hu/main>.

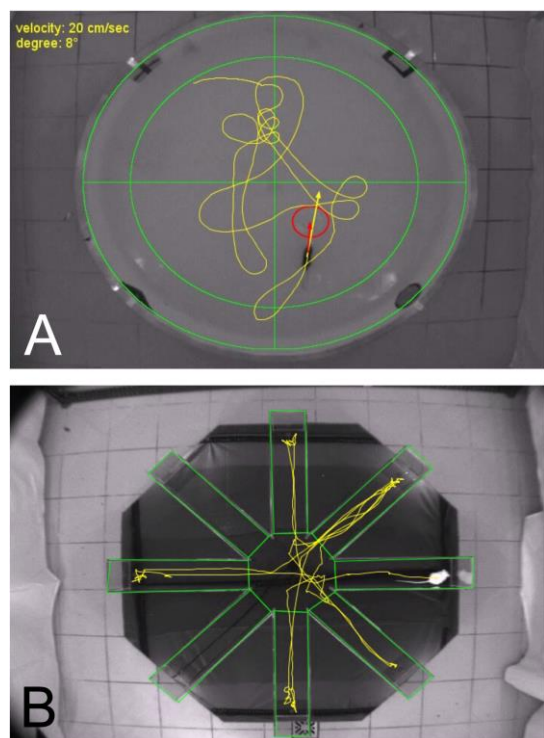
6.8.2. Az AnimalTracker használata

Az AnimalTracker alkalmazáshoz laboratóriumunk a <http://animaltracker.elte.hu/main> weboldalon egy részletes használati útmutatót és a felhasználóknak egy fórumot készített. A használati útmutatóban lépésről lépésre megismerhetjük a szoftver moduláris működését és interaktív ábrák segítségével a különböző képfeldolgozási lépések eredményeit is láthatjuk, a Java programozási nyelvben jártasak pedig elérhetik az alkalmazás szabadon felhasználható forráskódját is. A dolgozatnak ebben a

fejezetében csak a sugárlabirintus és a Morris-féle vízi labirintus tesztek kiértékeléséhez használt modulokat mutatom be (**44. ábra**).

A Morris-féle vízi labirintus tesztben tetszőlegesen megrajzolhatjuk a medencére illesztett zónákat/kvadránsokat (**44. A ábra**). Kialakíthatunk külső és belső körgyűrűket (zöld vonal) és a sziget feletti területet (piros kör) is céljainknak megfelelően jelölhetjük ki. A megtett utat az AnimalTracker sárga vonalakkal jelzi. Az alkalmazás képes az egér aktuális sebességét is kiszámolni, ezt láthatjuk a bal felső sarokban. A piacon elérhető fizetős és ingyenes szoftvercsomagok egyike sem képes az egerek aktuális helyzete és a célpont közötti szög folyamatos számolására. Ez azt mutatja, hogy mennyire célirányosan úszik az egér.

A sugárlabirintus teszt esetén is tetszőleges számú kart rajzolhatunk (zöld vonal),



44. ábra Az AnimalTracker jól leköveti az egerek mozgását a térbeli memóriát vizsgáló tesztekben. Az **(A)** panel szemlélteti a Morris-féle vízi labirintus tesztben, a **(B)** panel a sugárlabirintus tesztben az AnimalTracker alkalmazás, nyomkövető funkcióját. Saját felvételek.

ahol az egér mozoghat. Az egér által megtett utat sárga vonal jelzi.

Az eredmények összefoglalása

- A hippocampális idegsejtenyészetekben a dendrittüskék fejének kémiai úton (glicinnel kiváltott LTP és tartós KCl kezelés) kiváltott kiszélesedése során az endogén PKD aktivitása megnőtt.
- A domináns-negatív fenotípust mutató PKD mutáns (kdPKD-EGFP) és a PKD specifikus gátlószer (kbNB 142-70) alkalmazásával elért PKD aktivitás-csökkenés a dendritikus filopódiumok *in vitro* motilitását megnöveli.
- A PKD a dendrittüskékben a plaszticitáshoz szükséges F-aktin stabilizációt a cofilin inaktivációján keresztül, közvetetten szabályozza. A dinamikus reorganizáció állapotában, a korai LTP alatt a PKD a dendrittüskék aktin vázrendszerének szabályozásában nem játszik jelentős szerepet, ezzel szemben a konszolidáció alatt (a késői LTP során) a PKD cofilint inaktiváló hatása már érvényesül.
- A tenyésztett idegsejtekben a PKD aktivitás gátlása a protrúziók denzitását és a gomba morfológiájú dendrittüskék mennyiségét is lecsökkentette. A tartós KCl kezelés következtében kialakuló dendrittüske fejek kiszélesedésében a PKD fontos szerepet játszik.
- Transzgenikus egerek hippocampuszában a mutáns PKD-t termelő idegsejtek dendrittüskéinek területe a CA1 és CA3 régióban is lecsökkent. Immunarany jelöléssel kimutattuk, hogy a mutáns PKD a posztszinaptikus membrán közelében, a cofilin eloszlására is jellemző területen detektálható.
- A hippocampusban expresszáldó kdPKD-EGFP nem befolyásolja az egerek általános mozgásmintázatát és kognitív memóriáját, viszont a hippocampusz-dependens térbeli tanulási tesztekben (Morris-féle vízi labirintus és sugárlabirintus) a kdPKD-EGFP-t expresszáldó állatok gyengébben teljesítettek.
- Két új NIH Image/Fiji alapú alkalmazás létrehozásában vettem részt, amelyek a dendritikus filopódiumok motilitását (DFMA) illetve szabadon mozgó laboratóriumi rágsálók mozgását képesek követni és elemezni (AnimalTracker).

7. Megvitatás

Mint ahogy a Bevezetőben is bemutattam, a tanulási folyamatokhoz és a memória kialakulásához a dendrittüskék használatfüggő alak- és méretbeli változása elengedhetetlen. A dendrittüskék morfológiáját elsődlegesen a bennük található dinamikus vázrendszer, az aktin citoszkeleton polimerizációja és depolimerizációja határozza meg (Hotulainen és mtsai., 2009). Ismert, hogy a PKD a nem neuronális sejtekben az aktin vázrendszer dinamikájának szabályozásában fontos szerepet tölt be (Olayioye és mtsai., 2013). Doktori munkám során elsődleges célként azt tűztem ki, hogy a PKD dendrittüskékre és a tanulási folyamatokra gyakorolt hatását megvizsgáljam.

7.1. A dendrittüskék fejének kémiai úton kiváltott kiszélesedése során a PKD aktiválódik

A PKD aktivitás szenzorral végzett kísérletek jól mutatják, hogy az idegsejtek dendrittüskéiben kontroll körülmények között is kimutatható a PKD aktivitás. Ha ugyanis a sejteket a saját tápfolyadékukban tartva kbNB 142-70-el, a PKD specifikus gátlószerével kezeltük, akkor csökkent PKD aktivitást tapasztaltunk. Ez összefüggésben állhat azzal, hogy a posztiszinaptikus területeken magas a DAG termelődési arány, amelyet a posztiszinaptikus membránban lokalizált receptorok aktiválódása szabályoz (Kim és mtsai., 2009). Ide sorolhatjuk például az egyes tirozin kináz receptorokat vagy metabotróp glutamát receptorokat is (Rebecchi és Pentyal, 2000). A glicinnel kiváltott LTP során használt ECS-ben tartott sejtekben ezzel szemben az endogén PKD aktivitást nem tudtuk detektálni, hiszen a PKD gátlószere a PKD aktivitás szenzor foszforilációját nem csökkentette. Ez azzal magyarázható, hogy az eredeti tápfolyadék elvétele után az ECS-ből már hiányoznak azok a sejtek által szekretált faktorok, amelyek közvetve a PKD aktivitását is befolyásolják. Ezek közé tartozhatnak a különböző autokrin és parakrin szabályozó molekulák, mint például a különböző növekedési faktorok (epidermális növekedési faktor (EGF), idegi növekedési faktor (NGF)), amelyek a receptor tirozin kinázokhoz való kötődésük után PLC aktivációt okoznak (Rebecchi és Pentyal, 2000).

A GI-LTP kezelés egy elterjedt *in vitro* módszer arra, hogy a hippokampális tenyészetben az NMDA-receptortól függő morfológiai, strukturális és molekuláris változásokat lehessen előidézni (Goldin és mtsai., 2001; Park és mtsai., 2006). A glicinnel kiváltott LTP-vel az az állapot modellezhető, amikor az idegi hálózatokban a glutamát szinaptikus felszabadulása olyan mértékű, hogy az AMPA-receptorok mellett az NMDA receptorok is aktiválódnak. A GI-LTP kezelés során az ECS-ben több típusú gátlószer is jelen volt: a TTX a gyors,

feszültségfüggő nátrium csatornákat gátolja, amelynek következtében az idegsejtek akciós potenciáljai megszűnnek, a sztrichnin felelős a glicin- és acetil-kolin receptorok gátlásáért, a bikukullin kezeléssel pedig a GABA_A jelátvitelt akadályoztuk meg. A gátlószerek biztosították, hogy az NMDA-receptor koagonista glicin hozzáadására csak az NMDA-receptorfüggő jelátviteli útvonalak aktiválódhassanak a sejtekben.

Ismert, hogy az NMDA-receptorok aktiválódása az LTP és a memória kialakulásához szükséges (Lynch, 2004). Az NMDA-receptorok nyitásával a sejtekbe jutó kalciumionok számos jelátviteli útvonalat indítanak be. A CaMKII α aktiválásán keresztül az AMPA-receptorok foszforilációja és membránfelszíni kihelyeződése is megtörténik (Derkach és mtsai., 2007; Lu és mtsai., 2001). A kalciumionok másik közvetett célpontja a PKA működésének a serkentése. Ez további AMPA-receptor foszforilációhoz és transzkripciós faktorok aktiválásához fog vezetni, amely lépések a tüskefej morfológiai változásához, kiszélesedéséhez is szükségesek (Lonze és Ginty, 2002).

A rövid idejű, glicinnel kiváltott kémiai LTP során a dendrittüskékben az endogén PKD egyértelműen aktiválódott. A PKD aktiválódása NMDA-receptor függő módon következett be, ezt az APV¹⁷ kezeléssel meggátolható PKD aktivitás is bizonyította. Az NMDA-receptorok és a PKD közötti jelátviteli utak pontos szereplői egyelőre még ismeretlenek. A PKD aktivitásának megváltozásában szerepet játszhat az emelkedett kalcium szint, amely a konvencionális PKC-k aktivitását növeli. Az NMDA-receptorok aktiválódása következtében számos olyan intracelluláris jelátviteli út is megindul, amelynek eredményeképpen foszfatázok aktiválódnak. A foszfatázok (PP1 és PP2B) fontos szerepet játszanak a PKD, illetve szubsztrátjai defoszforilálásában is, így a PKD-függő hatásokat ellensúlyozhatják (Quinlan és Halpain, 1996).

A GI-LTP kezelést általában csak a rövid idejű, maximum egy órás időrendű változások követésére használják (Jaafari és mtsai., 2013). A glicinnel kiváltott LTP modellhez használt ECS-ben a sejtek döntő többsége az inkubáció során a 2. órára elpusztult, függetlenül attól, hogy az ECS-hezadtunk-e glicint vagy sem. Az APV kezelés hatására ugyan csökkent az elpusztult sejtek száma, de a 30 perces túléléshez képest ez még mindig magas volt. Ezzel bizonyítani tudtuk, hogy a sejtek pusztulásának hátterében nem az NMDA-receptorokon keresztül kiváltott excitotoxicitás, hanem a tenyészetek eredeti tápfolyadékának elvétele állhat. Az általunk alkalmazott tenyészetekben az idegsejtek egy konfluens asztrogliaszőnyegen növekednek. A gliák fontos szerepet játszanak különböző faktorok szekretálásában (pl. EGF,

¹⁷ Az APV az NMDA-receptorok kompetitív antagonistája.

NGF; korábban olvasható a növekedési faktorok hatása az idegsejtek életképességére), amely az idegsejtek életben maradásához szükséges, emellett részt vesznek a tápfolyadék ozmolaritásának, pH-jának beállításában és az idegsejtek metabolizmusának szabályozásában is (Volterra és Meldolesi, 2005). Ennek a problémának a megoldására a többi kísérletben, ahol GI-LTP protokollt alkalmaztunk és hosszabb túlélési időpontok megfigyelésére volt szükségünk, a glicin kezelést követően a sejtek az eredeti tápfolyadékukat kapták vissza. Ilyen körülmények mellett a tenyészetek minimum 6 órán át életben maradtak és a dendrittüskék tartós morfológiai változása, megnagyobbodása is megfigyelhető volt. Az eredeti GI-LTP protokoll megváltoztatását mások is alkalmazták, ha a kísérleteik során hosszabb, akár több napos túlélésre volt szükség (Li és mtsai., 2010; Cho és mtsai., 2013).

A tartós KCl kezelés következtében fellépő depolarizációs blokk az idegsejtek homeosztatikus plaszticitásának megváltozásához vezet (Grubb és Burrone, 2010). A 25 mM-ra emelt káliumion szint a sejtek nyugalmi membránpotenciáljának megnövekedését indukálja, amely során a sejtek aktivitása gátlódik, akciós potenciálok nem alakulnak ki, mert a membránpotenciál tartósan $-28,8 \pm 0,9$ mV körüli értéken van (ld. Bencsik és mtsai., 2015 S1/D ábra). A tartós KCl kezelés során fellépő struktúrális (tüskefej kiszélesedés) és funkcionális változások (akciós potenciálok kialakulásának gátlása) hasonlóak a tartós (legalább 48 óra) TTX kezelés során kialakuló homeosztatikus változásokhoz (Turrigiano és mtsai., 1998; Pérez-Otaño és Ehlers, 2005). Az idegsejtek a KCl kezelés következtében kialakuló tartós depolarizációs blokkhoz alkalmazkodva megnövelik a posztzinaptikus membránban a felszíni receptoraik számát (homeosztatikus upreguláció). Ezzel a mechanizmussal az idegsejtek érzékenyítik a bemeneteiket, válaszul arra, hogy ekkor akciós potenciálokat nem lehet regisztrálni, de a spontán glutamát felszabadítás még ekkor is megfigyelhető.

Ismert, hogy a hosszú idejű, tartós KCl kezelés nemcsak a dendrittüskék fejének a kiszélesedését okozza, hanem disztális irányba eltolja az AIS-t is. Ennek következtében az akciós potenciálok kialakulásához szükséges membránpotenciál-küszöb megnő. Az AIS helyének a megváltozásában a T- és L-típusú kalcium csatornák fontos szerepet játszanak (Grubb és Burrone, 2010; Evans és mtsai., 2013). Szerepüket a mi modellrendszerünkben is igazoltuk. Mivel KCl kezelés mellett az ω -conotoxin MVII C a PKD aktivitását nem csökkentette, a PKD aktiválásában a P/Q- és N-típusú kalcium csatornák nem játszanak szerepet. Ezzel szemben a KCl kezelés melletti nifedipin alkalmazás a kontroll szint alá csökkentette a PKD aktivitását. Ebből megállapíthatjuk, hogy a KCl kezelés során a T- és L-típusú kalcium csatornák aktiválódása a dendrittüskékben is szerepet játszhat a PKD aktivációjában.

A tartós KCl kezelés következtében kialakuló PKD aktivációban nemcsak a T- és L-típusú kalcium csatornák lehetnek érintettek, hanem valószínűsíthetően az NMDA-receptorok aktivációja is megtörténik. Ezt bizonyítja, hogy a KCl kezelés mellett az MK-801 alkalmazása képes volt a PKD aktivitását csökkenteni.

A dendrittüske morfológia vizsgálata során a domináns-negatív fenotípust mutató kdPKD-EGFP jelenléte megakadályozta a széles fejjel rendelkező gomba morfológiájú tüskék arányának növekedését. Ugyanezt figyelhettük meg az üres vektorral transzfektált idegsejtek esetében is, ha kbNB 142-70-et alkalmaztunk 16 órán keresztül. A PKD feltételezéseink szerint az aktin vázrendszerre gyakorolt hatásán keresztül képes ezt a folyamatot szabályozni.

7.2. A PKD az aktin stabilizációját szabályozza a dendrittüskékben

Az aktin vázrendszer dinamikája a dendritikus filopódiumok és a dendrittüskék motilitását és morfológiáját is szabályozza. A dendritikus filopódiumok gyors mozgású protrúziók, amelyek elsősorban a szekunder és terciér dendritágakból nőnek ki és a megfelelő preszinaptikus partner megtalálását követően stabilizálódhatnak és dendrittüskékké alakulhatnak. A gyors aktin turnover például gátolja a dendritikus filopódiumok stabilizációját (Tatavarty és mtsai., 2012). A hippocampális tenyészetekben a dendritikus protrúziók motilitását a PKD farmakológiai gátlása és a kináz inaktív mutáns túltermeltetése is megnövelte. Ebből megállapíthatjuk, hogy a filopódiumok stabilizációjában a PKD szerepet játszik. Megvizsgáltuk azt is, hogy a PKD a szinaptikus kapcsolattal már rendelkező dendrittüskék morfológiai átalakulásában vajon milyen szerepet tölt be.

Az alkalmazott kémiai kezeléstől és a detektálási technikától függően a dendrittüskék morfológiájának megváltozása időben eltérő lehet (Honkura és mtsai., 2008). Amint azt a Bevezetésben is említettem, a dendrittüskék főbb molekuláris komponenseinek mennyisége és eloszlása LTP indukciója után jellegzetesen megváltozik (Bosch és mtsai., 2014; **13. ábra**). Az LTP korai fázisában a dendrittüskék feje átmenetileg kiszélesedik (1-7 perc), amiért elsődlegesen a megnövekedett cofilin szint játszik szerepet. Ennek következtében az F-aktin vázrendszer gyors depolimerizációja figyelhető meg és ez vezet a tüskék fejének átmeneti megnövekedéséhez (Bae és mtsai., 2012). Ezt eredményeink is alátámasztják, hiszen a foszforilált cofilin szintje a glicinnel kiváltott LTP 30. percében jelentősen alacsonyabb volt, mint a kontroll tenyészetekben. 30 perc inkubálási idő után a kbNB 142-70 alkalmazása glicin jelenlétében nem volt hatással a foszforilált cofilin szintjére, valószínű, hogy az ebben a fázisban lezajló aktin átépülés szabályozásában a PKD nem játszik jelentős szerepet. Feltételezhetjük, hogy a korai LTP alatt lezajló folyamatokban a PKD aktiválódása mellett

számos más fehérje is szerepet játszik, amelyek a PKD hatását ellensúlyozva a cofilin defoszforilációja és aktivációja felé tolják el a szabályozást (Mizuno, 2013).

A kezdeti térfogati növekedés után a tüskék mérete valamivel csökken, és a kiindulási állapothoz képest megnövekedett méret a stabilizáció fázisa alatt már tartósan, akár egy órán túl is megmarad (Bosch és mtsai., 2014). A késői LTP eseménye során új fehérjék szintetizálódnak és biztosítják a PSD, illetve a dendrittüskék térfogati növekedését (Bosch és mtsai., 2014; **13. ábra**), amihez az aktin vázrendszer stabilizálódására és konszolidációjára is szükség van. A késői LTP során (120. percben) mért foszforilált cofilin intenzitás értékek ezt bizonyítják, ugyanis a kontrollhoz viszonyítva jelentősen megnőtt a foszforilált cofilin szintje. Ez a hatás kbNB 142-70 adásával ellensúlyozható volt, ebből megállapíthatjuk, hogy a konszolidáció során az aktin vázrendszer dinamikájának szabályozásában a PKD szerepet játszik. Ezt a következtetést egy másik módszer, az ún. actin barbed end assay alkalmazásával is meg tudtuk erősíteni. A dendrittüskékben a cofilin szintje meghatározza a beépíthető, szabad G-aktin monomerek számát. A glicinnel kiváltott LTP során a konszolidáció fázisában, a szabad plusz végre beépülő G-aktin monomerek intenzitása/mennyisége kbNB kezelése hatására megnőtt. (Az aktin barbed end assay elemzéseket Szíber Zsófia készítette; Bencsik és mtsai., 2015 2/G-I ábra).

A konszolidáció fázisában a PKD közvetve számos járulékos célfehérjén keresztül is képes az aktin vázrendszer stabilizációját biztosítani. Ennek egyik tagja a cofilin, amelynek inaktivációját két jelátviteli úton keresztül is szabályozhatja a PKD: egyrészt a PAK4-LIMK1/2 kaszkád rendszer foszforilációján keresztül, másrészt pedig az SSH foszforilálásán (inaktiválásán) keresztül. Ezek az útvonalak az idegsejtekben is PKD szabályozás alatt állnak. Sikerült bizonyítanunk, hogy kontroll esetben és KCl kezelés hatására is, kbNB 142-70 mellett, a foszforilált PAK4 és foszforilált SSH mennyisége lecsökkent (A Western blot elemzéseket Liliom Hanna készítette; Bencsik és mtsai., 2015 S2/E-H ábra). A PKD az aktin vázrendszer dinamikáját még a cortactin¹⁸ foszforilálásán keresztül is képes szabályozni, de ezt az útvonalat mi nem vizsgáltuk.

Elektronmikroszkópos technikával detektálható, hogy a dendrittüskék fejében az aktin-kötő fehérjék (cofilin, cortactin és Arp2/3 komplex) szabályozott elrendezésben oszlanak el. A cofilin alapvetően a dendrittüskék membránhoz közeli (shell) régiójában, az aktin beépülés helyén detektálható, a posztszinaptikus denzitás közelében. Az Arp2/3 komplex az extraszinaptikus membrán alatti területen, torroid formában helyezkedik el, míg a cortactin a

¹⁸ A cortactin nagy mennyiségben megtalálható a dendrittüskékben és a PKD-n keresztüli foszforilációja a dendrittüskék stabilizációját biztosítja (Hering és Sheng, 2003).

dendrittűskék fejének központi területén (core régió) akkumulálódik (Racz és Weinberg, 2006; Rácz és Weinberg, 2008).

A Rácz Bencével kollaborációban elvégzett elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján a kdPKD-EGFP-t termelő, kettős transzgén állatokban immunarany jelöléssel kimutattuk, hogy a kináz inaktív PKD a posztszinaptikus membrán közelében, az aktin depolimerizációjáért felelős cofilinra jellemző területen detektálható. Így valószínű, hogy a PKD közvetlenül a posztszinaptikus membrán alatt, a PSD közelében lokalizált, dinamikus aktin vázrendszer szabályozásában aktív szerepet játszik.

7.3. A kdPKD-EGFP expressziójának hatása az idegsejtek működésére és az állatok általános viselkedésére

Az elektronmikroszkópos felvételek alapján a Ni-DAB csapadékot, amely a kdPKD-EGFP expressziójának helyét jelzi, a hippocampusz CA1 és CA3 régió dendritjeiben figyeltük meg. Ennek kapcsán elektrofiziológiai mérésekkel szeretnénk volna vizsgálni a kdPKD-EGFP expressziójának a hatását. A hippocampális agyszeletek CA1-es régiójában elhelyezkedő piramissejteken többféle módon is kiváltható LTP. Az egyik, általánosan alkalmazott protokoll szerint közvetlenül a Schaffer-kollaterálist ingereljük, a mezőpotenciál változásokat pedig a CA1 régió stratum pyramidale-ban rögzítjük. Ebben az esetben az LTP egy monoszínaptikus kapcsolaton keresztül alakul ki (Lynch, 2004). Egy másik, nem szokványos eljárás szerint az ingerlő elektróddal a gyrus dentatusból eredő moharostokat ingereljük és szintén a CA1 régió stratum pyramidale-ban rögzítjük a mezőpotenciálokat. Ebben az esetben az LTP egy biszínaptikus kapcsolaton keresztül váltódik ki, hiszen a moharostok először a CA3 régió területén szinaptizálnak, majd a CA3 régió piramissejtjeinek axonkötege a Schaffer-kollaterálisok formájában éri el a CA1-es régiót. Mivel az elektronmikroszkópos elemzések szerint a kdPKD-EGFP expresszió a CA3 és a CA1 régió dendritjeiben és dendrittűskéiben is kimutatható volt, mind a két ingerlési formát alkalmaztuk. (Az elektrofiziológiai méréseket Borbély Sándor végezte (Bencsik és mtsai., 2015 5/H-L).

Az elektrofiziológiai mérések során a kontroll és a kettős transzgén egerek hippocampális piramissejtjeinek alap-ingerlékenységében nem tapasztaltunk különbséget. Ezek az eredmények összecsengenek azzal, hogy a nyílt porond tesztben a két vizsgált állatcsoport teljesítményében (mozgásmintázat, helypreferencia és szorongás) nem találtunk különbséget, bár az elektronmikroszkópos megfigyelések alapján a kettős transzgén állatok dendrittűskéi általánosságban kisebb területűek. Ebből arra következtethetünk, hogy a kináz inaktív PKD mutáns normál körülmények között nem befolyásolja az állatok hippocampális

agyszeleteiből mérhető elektrofiziológiai paramétereket és az állatok viselkedését. Az *in vitro* tüskemorfológia elemzések is a fenti kijelentést támasztják alá, ugyanis önmagában a kbNB 142-70 alkalmazása a tenyészetekben nem változtatta meg a kontrollhoz viszonyítva a dendrittüskék eloszlását.

7.4. A PKD aktivitás gátlásának hatása az állati tanulásra

A PKD ortológ fehérje formája *Caenorhabditis elegans*-ban a DKF-2B fehérje (*C. elegans* specifikus D kináz család -2B). Fu és munkatársai kimutatták, hogy a DKF-2B-nek alapvető szerepe van a fonálférgek egyes tanulási folyamataiban. A kemotaxis assay-ben¹⁹ a DKF-2B null mutáns állatok kontroll társaikkal szemben a számukra magas sótartalmú averzív folyadékot nem kerülték el. Ebből arra következtethetünk, hogy asszociatív tanulási képességük nem megfelelő (Fu és mtsai., 2009). A PKD emlős viselkedésben betöltött szerepét a kokain kezeléssel kiváltott lokomotoros hiperaktivitásban is vizsgálták. Ekkor a középagyban a dopaminoceptív posztzinaptikus sejtben a PKD aktiválódása megtörténik, amelynek következtében a dopamin receptorok mennyisége megnő és G-fehérje kapcsolt szignalizációs útvonalak aktiválódását figyelhetjük meg (Wang és mtsai., 2014).

Az elektrofiziológiai mérések során az LTP kiváltása után a populációs spike-ok amplitúdójának növekedése a mono- és a biszinaptikus ingerlés esetén is szignifikánsan kisebb volt a kdPKD-EGFP-t termelő állatok esetében, mint a kontroll állatokban (Bencsik és mtsai., 2015 5/G-L ábra). Ez összhangban áll azzal, hogy a térbeli tanulási tesztekben csak a második héttől látunk szignifikáns különbséget az állatcsoportok között. Az első hét során a két állatcsoport közel azonosan szerepelt, ha azonban az állatoknak a hosszú távú memóriájukat kell használni (pl. a csali falatok helyének megtanulása során), amelyhez a dendrittüskék morfológiai átalakulása szükséges, akkor a kettős transzgén állatok rosszabbul teljesítettek. Ennek hátterében az állhat, hogy a dendrittüskék morfológiájának átalakulása az aktin dinamikájának megváltozásától függ, amely cofilin által szabályozott (Rust és mtsai., 2010). Ezt a folyamatot a PKD a korábban tárgyalt *in vitro* eredményeink alapján is szabályozni tudja.

A hippocampusban specifikusan expresszáldó kdPKD-EGFP hatását az egerek viselkedésére négy különböző tesztrendszerben is vizsgáltuk. Az új tárgy felismerése teszt kapcsán a mai napig vitatott, hogy pontosan mely agyi struktúrák szabályozzák ezt a mechanizmust (Antunes és Biala, 2012). Egyes feltételezések szerint a hippocampus aktivitása

¹⁹ A kemotaxis assay alkalmas a fonálférgek asszociatív tanulási képességeinek a vizsgálatára. A teszt kezdetén az állatokat ízaverziót kialakító magas só tartalmú pufferben előinkubálják. 1 óra múlva azt vizsgálhatjuk, hogy a magas só tartalmú pufferben előinkubált állatok mennyit mozognak időegység alatt egy számukra optimális sótartalmú célpont felé.

az új tárgy felismerése szempontjából csak az akvizíció alatt számottevő. Ekkor a térbeli pozicionálás és a különböző tárgyak egymáshoz viszonyított helyzetének a monitorozására korlátozódik a hippocampusz aktivitása. A retenciómérés során az állatok már egy habituált környezetbe kerülnek, ezért a hippocampusz aktivitása ebben a szakaszban nem jelentős (Oliviera és mtsai., 2010). Ekkor a temporális lebeny parahippokampális régiója (perirhinális kéreg, entorhinális kéreg és az inferior temporális kéreg) játszik fontos szerepet, ahol a 16 hetes doxiciklines kezelés után sem találtunk jelentős kdPKD-EGFP expressziót. Ezért nem meglepő, hogy a két állatcsoport közel azonos eredményekkel teljesíti ezt a feladatot.

A hippocampusz-dependens térbeli tanulási tesztekben (Morris-féle vízi labirintus és sugárlabirintus) a kdPKD-EGFP-t expresszáló állatok gyengébben teljesítettek és a tréningek előrehaladtával sem mutattak javuló eredményeket. A sugárlabirintus tesztben a csali karba történő belépések száma a két állatcsoportban közel azonos volt (munkamemória-függő folyamat). A rövid ideig tárolt munkamemória kialakulásához cofilintől és aktintól független útvonalak aktiválódása szükséges (Rust és mtsai., 2010). Az üres karba belépések száma között viszont a teszt második hetére különbség mutatkozott (a kettős transzgén állatok több alkalommal mentek be az üres karokba, akár többször is). A tanulásnak ezt a típusát referencia memóriának hívjuk. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a PKD aktivitása elsősorban a memória e formájának kialakításában játszik szerepet.

A dendrittüskék alakjának meghatározásában még fontos szerepet tölt be a neurotranszmitter receptorok exo- és endocitózisa is (Park és mtsai., 2006; Anggono és Huganir, 2012). A PKD két neuronális szubsztátja, a RIN1 és a rabaptin-5 fehérje foszforilációján keresztül is képes befolyásolni az endocitotikus folyamatokat (Deininger és mtsai., 2008; Christoforides és mtsai., 2012). Kutatócsoportunk eredményei alapján valószínűsíthető, hogy az endogén PKD hosszú távú gátlása a korai és visszatérő endoszomális rendszer blokkolásával az AMPA-receptorok felszíni kihelyeződését is csökkenti. Ennek bizonyítása egy másik doktori munka témája lesz.

A digitális képfeldolgozó alkalmazások használata (DFMA, AnimalTracker) a doktori dolgozat elkészítéséhez elengedhetetlen volt. Az NIH ImageJ alapú környezetben futó, szabad hozzáférésű, szemi-automata működésű alkalmazások a dinamikus folyamatok elemzésére alkalmasak. Reményeink szerint a jövőben a tudományos közösség is hasznát veszi ezeknek a fejlesztéseknek.

8. Összefoglalás

A protein kináz D (PKD) család tagjai a szerin/treonin kinázok egy újonnan elkülönített csoportját alkotják. A PKD fehérje a DAG-hoz való kötésen keresztül átmenetileg a plazma- és endomembránokhoz is kihorgonyozódik. Az általánosan elfogadott nézet szerint a PKD számos molekuláris útvonalat sejttípus-függő módon képes szabályozni. A PKD-ról ismert, hogy nem idegi sejtekben az F-aktin vázrendszer stabilizálódását több jelátviteli útvonalon keresztül is képes befolyásolni, így a migrációs, áttétképzési és adhézis sajátságokat is irányítja. A PKD központi idegrendszerben betöltött szerepéről azonban még kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A központi idegrendszerben a dendrittüskék az idegsejtek dendritfáján kialakuló aktinban gazdag kitüremkedések, amelyek a serkentő szinapszisok általános helyszínéként szolgálnak. Az aktin vázrendszer kulcsszerepet tölt be a dendrittüskék kialakulásában és visszahúzódásában, valamint meghatározza a dendrittüskék méretét és alakját is.

Doktori munkám során a PKD funkcióját kutattam egérből kinyert hippokampális idegsejtenyészetek érett dendrittüskéiben. Tenyésztett idegsejtekben a glicinnel kiváltott kémiai LTP és a hosszú távú KCl kezelés (depolarizációs blokk) esetén igazolni tudtuk, hogy a PKD aktivitása a dendrittüskékben lezajló morfológiai átalakulásokhoz szükséges. Feltételezzük, hogy a dendrittüskék fejének használatfüggő átalakulásához és stabilizálódásához szükséges a cofilin foszforilációjának PKD-tól függő szabályozása. Az endogén PKD funkció gátlása a morfológiai változások mellett a szinaptikus plaszticitást, így az LTP kialakulását, illetve a PKD domináns-negatív, mutáns formáját indukálhatóan termelő, transzgenikus egerek tanulási képességét is jelentősen rontja. Mindezek alapján a PKD a szinaptikus plaszticitás és a tanulási folyamatok szabályozásában a dendrittüskékben zajló aktin-turnover stabilizálásán keresztül vesz részt.

A kutatócsoportunk által kifejlesztett alkalmazások (DFMA és AnimalTracker) lehetővé tették, hogy a dendritikus filopódiumok, illetve az egerek mozgását nyomon követhessük.

9. Summary

The protein kinase D (PKD) family has recently become a separate group within the serine-threonine kinases; its members are recruited to the plasma membrane or intracellular membranes via binding DAG. One of PKD's special features is that it integrates several signalling pathways in a cell type- and stimulus-dependent manner. In non-neuronal cells, PKD has important role in stabilizing F-actin via multiple pathways (e.g. migration, metastasis and adhesion). However, just few aspects of PKD functions are known in the central nervous system. Excitatory inputs in the central nervous system mainly target dendritic spines, which are small actin-rich protrusions formed along neuronal dendrites. The actin cytoskeleton plays a pivotal role in the formation, regulation or elimination of dendritic spines.

In this work, PKD function was investigated in mature dendritic spines using mouse embryonal hippocampal cultures. We used *in vitro* models of neuronal plasticity, such as glycine-induced chemical LTP (GI-LTP) or long-term depolarization block by KCl treatment. We proved that PKD activity is necessary for GI-LTP and depolarization-induced F-actin stabilization in dendritic spines. We conclude that during activity-induced potentiation and enlargement of spines, a net increase in F-actin levels is provoked and maintained by a decrease in the actin-depolymerizing activity of cofilin. Inhibition of PKD activity, either by a specific PKD inhibitor or by expressing a dominant-negative PKD mutant, blocks activity-dependent changes in hippocampal dendritic spines, including synaptic plasticity as well as LTP formation, and has deleterious consequences on spatial memory formation. Thus, PKD controls synaptic plasticity and learning by regulating actin turnover and stability in dendritic spines.

The plugins (DFMA and AnimalTracker) developed by our research group are universal tracking applications freely available to the scientific community.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti Dr. Détári Lászlót és Dr. Világi Ildikót, az ELTE-TTK Élettani és Neurobiológiai Tanszék korábbi és jelenlegi vezetőjét, hogy a doktori disszertációm elkészítéséhez szükséges tanszéki háttérrel biztosították.

Külön köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Schlett Katalinnak, hogy munkám során szakmai ismeretekkel és tanácsokkal látott el és irányítása alatt elsajátíthattam a tudományos kutatás elvi és gyakorlati alapjait, illetve nem utolsósorban a doktori disszertáció elkészítésében nyújtott mérhetetlen segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Tárnok Krisztiánnak, hogy bármikor fordulhattam hozzá elméleti és gyakorlati kérdéseimmel és a munkámon kívül is számíthattam segítségére.

Nagyon köszönöm az Idegi Sejtbiológiai Laboratórium minden korábbi és jelenlegi munkatársának és hallgatójának a támogatását és közreműködését, amely segítette a dolgozat elkészítését. Baráti köszönettel tartozom Hannának és Marcinak.

Köszönöm Dr. Rácz Bencének az elektronmikroszkópos vizsgálatok során nyújtott segítségét. Az elektrofiziológiai mérések kapcsán megköszönöm Dr. Borbély Sándor és Dr. Szűcs Attila munkáját.

Hálámat fejezem ki Dr. Angelika Haussernek és Dr. Klaus Pfizenmaiernek, amiért a Stuttgarteri Egyetem Sejt és Immunológiai Intézetében dolgozhattam. Külön köszönöm Dr. Kornelia Ellwangernek, hogy a kint tartózkodásom során mindenben a segítségemre volt.

Nagyon köszönöm volt szegedi témavezetőim Dr. Szigeti Csaba és Dr. Légrádi Ádám és korábbi szegedi tanszékvezetőm Dr. Gulya Károly segítségét, hogy vezetésükkel tapasztalatot szerezhettem a kísérletezés és kutatás terén.

Külön köszönettel tartozom gimnáziumi biológia tanáraimnak Stefanik Klárának és Dr. Zsilinszky Tibornak, hogy felkeltették érdeklődésemet a biológia iránt.

Köszönöm a családomnak, hogy tanulmányaim során végig biztos háttérrel alakítottak ki és támogattak. Külön köszönöm feleségemnek, Rékának, hogy mindvégig megértő és türelmes volt.

Köszönöm Dr. Varró Petrának és Dr. Kékesi Adrienna Katalinnak, hogy elvállalták a doktori dolgozatom tanszéki bírálatát.

11. Hivatkozások

- Ackermann, M., Matus, A. (2003). Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nature Neuroscience*. **6**(11): 1194–1200. doi:10.1038/nn1135
- Anggono, V., Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. **22**(3): 461–69. doi:10.1016/j.conb.2011.12.006
- Antunes, M., Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*. **13**(2): 93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
- Avkiran, M., Rowland, A.J., Cuello, F., Haworth, R.S. (2008). Protein kinase D in the cardiovascular system: emerging roles in health and disease. *Circulation Research*. **102**(2): 157–63. doi:10.1161/circresaha.107.168211
- Bae, J., Sung, B.H., Cho, I.H., Song, W.K. (2012). F-actin-dependent regulation of NESH dynamics in rat hippocampal neurons. *PLoS ONE*. **7**(4): 4–15. doi:10.1371/journal.pone.0034514
- Barbosa, A.C, Kim, M.S., Ertunc, M., Adachi, M., Nelson, E.D., McAnally, J., Richardson, J.A., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., Bassel-Duby, R., Olson, E.N. (2008). MEF2C, a transcription factor that facilitates learning and memory by negative regulation of synapse numbers and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**(27): 9391–96. doi:10.1073/pnas.0802679105
- Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Maffei, L., Sale, A. (2011). Brain plasticity and disease: a matter of inhibition. *Neural Plasticity*. **2011**:11. doi:10.1155/2011/286073
- Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yáñez, I., DeFelipe, J., Yuste, R. (2002). Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. *Journal of Neurocytology*. **31**(3-5): 337–46. doi:10.1023/A:1024134312173
- Bencsik, N., Szíber, Z., Liliom, H., Tárnok, K., Borbély, S., Gulyás, M., Rátkai, A., Szűcs A., Hazai-Novák, D., Ellwanger, K., Rácz, B., Pfizenmaier, K., Hausser, A., Schlett, K.

- (2015). Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation. *The Journal of Cell Biology*. **210**(5): 1–13. doi:10.1083/jcb.201501114
- Berlucchi, G., Buchtel, H.A. (2009). Neuronal plasticity: Historical roots and evolution of meaning. *Experimental Brain Research*. **192**(3): 307–19. doi:10.1007/s00221-008-1611-6
- Bisbal, M., Conde, C., Donoso, M., Bollati, F., Sesma, F., Quiroga, S., Díaz Añel A., Malhotra, V., Marzolo, M.P., Cáceres, A. (2008). Protein kinase D regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons. *The Journal of Neuroscience*. **28**(37): 9297–9308. doi:10.1523/JNEUROSCI.1879-08.2008
- Bliss, J.M., Gray, E.E., Dhaka, A., O'Dell, T.J., Colicelli, J. (2010). Fear learning and extinction are linked to neuronal plasticity through Rin1 signaling. *The Journal of Neuroscience Research*. **88**(4): 917–26. doi:10.1002/jnr.22252
- Bliss, T.V.P., Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*. **232**: 331-356.
- Blitz, D.M., Foster, K.A., Regehr, W.G. (2004). Short-term synaptic plasticity: a comparison of two synapses. *Nature reviews. Neuroscience*. **5**(8): 630–40. doi:10.1038/nrn1475
- Boeckers, T.M. (2006). The postsynaptic density. *Cell and Tissue Research*. **326**(2): 409–22. doi:10.1007/s00441-006-0274-5
- Brooks, S.P., Dunnett, S.B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature reviews. Neuroscience*. **10**(7): 519-29. doi:10.1038/nrn2652
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi T., Matsuno, H., Sur, M., Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*. **82**(2): 444–59. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.021
- Bossuyt, J., Chang C.W., Helmstadter, K., Kunkel, M.T., Newton, A.C., Campbell K.S., Martin, J.L., Bossuyt, S., Robia S.L., Bers, D.M. (2011). Spatiotemporally distinct protein kinase D activation in adult cardiomyocytes in response to phenylephrine and endothelin. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(38): 33390–400. doi:10.1074/jbc.M111.246447

- Castrén, E., Hen, R. (2013). Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends in Neurosciences*. **36**(5): 259–67. doi:10.1016/j.tins.2012.12.010
- Catterall, W.A., Swanson, T.M. (2015). Structural basis for pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Molecular Pharmacology*. **88**:141-150. doi:10.1124/mol.114.097659
- Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., Morris, R.G.M. (2000). A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. **408**(6815):975-9. doi:10.1038/35050103
- Chen, X., Nelson, C.D., Li, X., Winters, C.A., Azzam, R., Sousa, A.A., Leapman, R.D., Gainer, H., Sheng, M., Reese, T.S. (2011). PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. *The Journal of Neuroscience*. **31**(17): 6329–38. doi:10.1523/JNEUROSCI.5968-10.2011
- Cho, T., Ryu, J.K., Taghibiglou, C., Ge, Y., Chan, A.W., Liu, L., Lu, J., McLarnon, J.G., Wang, Y.T. (2013). Long-term potentiation promotes proliferation/survival and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells. *PLoS ONE*. **8**(10). doi:10.1371/journal.pone.0076860
- Christoforides, C., Rainero, E., Brown, K.K., Norman, J.C., Toker, A. (2012). PKD controls $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin recycling and tumor cell invasive migration through its substrate rabaptin-5. *Developmental Cell*. **23**(3): 560–72. doi:10.1016/j.devcel.2012.08.008
- Cingolani, L.A., Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature reviews. Neuroscience*. **9**(5): 344–56. doi:10.1038/nrn2410
- Citri, A., Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. **33**(1): 18–41. doi:10.1038/sj.npp.1301559
- Collingridge, G.L., Peineau, S., Howland, J.G., Wang, Y.T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature reviews. Neuroscience*. **11**(7): 459–73. doi:10.1038/nrn2867
- Contractor, A., Mulle, C., Swanson, G.T. (2011). Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends in Neurosciences*. **34**(3): 154–63. doi:10.1016/j.tins.2010.12.002

- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M., Fiala, J.C. (2002). Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *The Journal of Neuroscience*. **22**(6): 2215–24. doi:22/6/2215 [pii]
- Cortés, R.Y., Arévalo, J.C., Magby, J.P., Chao, M.V., Plummer, M.R. (2007). Developmental and activity-dependent regulation of ARMS/Kidins220 in cultured rat hippocampal neurons. *Developmental Neurobiology*. **67**(13): 1687–98. doi:10.1002/dneu.20542
- Czöndör, K., Ellwanger, K., Fuchs, Y.F., Lutz, S., Mansuy, I.M., Hausser, A., Pfizenmaier, K., Schlett, K. (2009). Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons. *Molecular Biology of the Cell*. **20**: 2108–20. doi:10.1091/mbc.E08
- Döppler, H., Storz, P. (2007). A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase D contributes to oxidative stress-mediated activation. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**(44): 31873–81. doi:10.1074/jbc.M703584200
- Deininger, K., Eder, M., Kramer, E.R., Zieglgänsberger, W., Dodt, H.U., Dornmair, K., Colicelli, J., Klein, R. (2008). The Rab5 guanylate exchange factor Rin1 regulates endocytosis of the EphA4 receptor in mature excitatory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**(34): 12539–44. doi:10.1073/pnas.0801174105
- Derkach, V.A., Oh, M.C., Guire E.S., Soderling, T.R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* **8**(2): 101–103. doi:10.1038/nrn2055
- Ebert, D.H., Greenberg, M.E. (2013). Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature*. **493**: 327–337. doi:10.1038/nature11860
- Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience*. **6**(3): 231–42. doi:10.1038/nn1013
- Eiseler, T., Hausser, A., Kimpe, L.D., Lint, J.V., Pfizenmaier, K. (2010). Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(24): 18672–83. doi:10.1074/jbc.M109.093880

- Ellwanger, K., Hausser, A. (2013). Physiological functions of protein kinase D in vivo. *IUBMB Life*. **65**(2): 98–107. doi:10.1002/iub.1116
- Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F.J., Kufe D.F., Datta, R. (2000). Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C μ by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**(24): 18476–81. doi:10.1074/jbc.M002266200
- Evans, M.D., Sammons, R.P., Lebron, S., Dumitrescu, A.S., Watkins, T.B., Uebele, V.N., Renger, J.J., Grubb, M.S. (2013). Calcineurin signaling mediates activity-dependent relocation of the axon initial segment. *The Journal of Neuroscience*. **33**(16): 6950–63. doi:10.1523/jneurosci.0277-13.2013
- Feng, W., Zhang, M. (2009). Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nature reviews. Neuroscience*. **10**(2): 87–99. doi:10.1038/nrn2540
- Fiala, J.C., Spacek, J., Harris, K.M. (2002). Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders? *Brain Research Reviews*. **39**(1): 29–54. doi:10.1016/S0165-0173(02)00158-3
- Fifková, E., Delay, R.J. (1982). Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *The Journal of Cell Biology*. **95**(1): 345–50.
- Fortin, D.A., Davare M.A., Srivastava T., Brady, J.D., Nygaard, S., Derkach, V.A., Soderling, T.R. (2010). Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-Kinase I. *The Journal of Neuroscience*. **30**(35): 11565–75. doi:10.1523/JNEUROSCI.1746-10.2010
- Fu, Y., Ren, M., Feng, H., Chen, L., Altun, Z.F., Rubin, C.S. (2009). Neuronal and intestinal protein kinase d isoforms mediate Na⁺(salt taste)-induced learning. *Science signaling*. **2**(83): ra42. doi:10.1126/scisignal.2000224
- Fuchs, Y.F., Eisler, S.A., Link, G., Schlicker, O., Bunt, G., Pfizenmaier, K., Hausser, A. (2009). A Golgi PKD activity reporter reveals a crucial role of PKD in nocodazole-induced Golgi dispersal. *Traffic*. **10**(12): 858–67. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00918.x
- Fugmann, T., Hausser, A., Schöffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., Olayioye, M.A. (2007).

- Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *The Journal of Cell Biology*. **178**(1): 15–22. doi:10.1083/jcb.200612017
- García-López, P., García-Marín, V., Freire, M. (2007). The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Progress in Neurobiology*. **83**(2): 110–30. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.06.002
- Gellért, L., Varga, D., Ruzska, M., Toldi, J., Farkas, T., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Kis, Zs. (2012). Behavioural studies with a newly developed neuroprotective KYNA-amide. *Journal of Neural Transmission. (Vienna)* **119**(2): 165–72. doi:10.1007/s00702-011-0692-8
- Ghanekar, Y., Lowe, M. (2005). Protein kinase D: activation for Golgi carrier formation. *Trends in Cell Biology*. **15**(10): 511–14. doi:10.1016/j.tcb.2005.08.001
- Goldin, M., Segal, M., Avignone, E. (2001). Functional plasticity triggers formation and pruning of dendritic spines in cultured hippocampal networks. *The Journal of Neuroscience*. **21**(1): 186–93.
- Golgi, C. (1873). Sulla sostanza grigia del cervello. *Gazz. Med. Ital. Lombardia*. **6**: 244–46.
- Grubb, M.S., Burrone, J. (2010). Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*. **465**:(7301): 1070–74. doi:10.1038/nature09160
- Gulyás, M., Bencsik, N., Pusztai, S., Liliom, H., Schlett, K. (2016). AnimalTracker: an ImageJ-based tracking API to create customized behavioural analyser program. *Neuroinformatics*. **14**(4): 479–481. (2016). doi: 10.1007/s12021-016-9303-z
- Hall, C.S. (1934). Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. *Journal of Comparative Psychology*. **17**(1): 89–108. doi:10.1037/h0073676
- Halpain, S. (2000). Actin and the agile spine: How and why do dendritic spines dance? *Trends in Neurosciences*. **23**(4): 141–46. doi:10.1016/S0166-2236(00)01576-9
- Hammond, R.S., Tull, L.E., Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. **82**(1): 26–34. doi:10.1016/j.nlm.2004.03.005

- Harris, K.M., Stevens, J.K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of Neuroscience*. **9**(8): 2982–97.
- Harris, K.M., Weinberg, R.J. (2012). Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **4**(5): pii: a005587. doi:10.1101/cshperspect.a005587
- Hausser, A., Link, G., Bamberg, L., Burzlaff, A., Lutz, S., Pfizenmaier, K., Johannes, F.J. (2002). Structural requirements for localization and activation of protein kinase C μ (PKC μ) at the Golgi compartment. *The Journal of Cell Biology*. **156**(1): 65–74. doi:10.1083/jcb.200110047
- Hausser, A., Märtens, S., Link, G., Pfizenmaier, K. (2005). Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylation and activation of phosphatidylinositol-4 kinase III β at the Golgi complex. *Nature Cell Biology*. **7**(9): 880–886. doi: 10.1038/ncb1289
- Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S., Saito, T. (1999). PKC η , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . *Biochimica et Biophysica Acta*. **1450**(1): 99–106. doi:10.1016/S0167-4889(99)00040-3
- Hayashi, M.K., Tang, C., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M.H., Xu, R.M., Li, H., Sala, C., Hayashi Y. (2009). The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell*. **137**(1): 159–71. doi:10.1016/j.cell.2009.01.050
- Hebb, D.O. (1949). The organization of behavior. *New York: Wiley & Sons*.
- Hering, H., Sheng, M. (2003). Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *The Journal of Neuroscience*. **23**(37): 11759–69. doi:23/37/11759
- Higley, M.J., Sabatini, B.L. (2012). Calcium signaling in dendritic spines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **4**(4): a005686–a005686. doi:10.1101/cshperspect.a005686
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H.. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*. **57**(5): 719–29. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.013
- Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A. (2010). Dendritic spine plasticity : new regulatory roles of

- dynamic microtubules. *The Neuroscientist*. **16**(6): 650-61. doi:10.1177/1073858410386357
- Horton, A.C., Rácz, B., Monson, E.E., Lin, A.L., Weinberg, R.J., Ehlers, M.D. (2005). Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron*. **48**(5): 757–71. doi:10.1016/j.neuron.2005.11.005
- Hotulainen, P., Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of Cell Biology*. **189**(4): 619–29. doi:10.1083/jcb.201003008
- Hotulainen, P., Llano, O., Smirnov, S., Tanhuanpää, K., Faix, J., Rivera, C., Lappalainen, P. (2009). Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*. **185**(2): 323–39. doi:10.1083/jcb.200809046
- Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., Dent, E.W. (2008). Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *The Journal of Neuroscience*. **28**(49): 13094–105. doi:10.1523/JNEUROSCI.3074-08.2008
- Humphries, E.S.A., Dart, C. (2015). Neuronal and cardiovascular potassium channels as therapeutic drug targets: promise and pitfalls. *The Journal of Biomolecular Screening*. **20**(9):1055-73. doi:10.1177/1087057115601677
- Hung, A.Y., Futai, K., Sala, C., Valtschanoff, J.G., Ryu, J., Woodworth, M.A., Kidd, F.L., Sung, C.C., Miyakawa, T., Bear, M.F., Weinberg, R.J., Sheng, M. (2008). Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *The Journal of Neuroscience*. **28**(7): 1697–1708. doi:10.1523/JNEUROSCI.3032-07.2008
- Hurd, C., Waldron, R.T., Rozengurt, E. (2002). Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus. *Oncogene*. **21**(14): 2154–60. doi:10.1038/sj.onc.1205290
- Iglesias, T., Rozengurt, E. (1998). Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**(1): 410–16. doi:10.1074/jbc.273.1.410
- Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M.P., Naven, T.J.P., Rozengurt, E., Schiavo, G. (2000).

- Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**(51): 40048–56. doi:10.1074/jbc.M005261200
- Jaafari, N., Konopacki, F.A., Owen T.F., Kantamneni, S., Rubin, P., Craig, T.J., Wilkinson, K.A., Henley, J.M. (2013). SUMOylation is required for glycine-induced increases in AMPA receptor surface expression (ChemLTP) in hippocampal neurons. *PLoS ONE*. **8**(1): e52345. doi:10.1371/journal.pone.0052345
- Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hemstreet, G.P., Balaji, K.C. (2005). E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1 / protein kinase C μ is associated with altered cellular aggregation and in prostate cancer. *Cancer Research*. **65**: 483–92.
- Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C. (2009). Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron*. **61**(1): 85–100. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.013
- Jensen, E.D., Gopalakrishnan, R., Westendorf, J.J. (2009). Bone morphogenic protein 2 activates protein kinase D to regulate histone deacetylase 7 localization and repression of Runx2. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(4): 2225–33. doi:10.1074/jbc.M800586200
- Johannes, F.J., Prestle J., Eis, S., Oberhagemann, P., Pfizenmaier, K. (1994). PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(8): 6140–48.
- Jones, E.G, Powell, T.P. (1969). Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *The Journal of Cell Science*. **5**(2): 509–29.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*. **33**(3): 121–29. doi:10.1016/j.tins.2010.01.001
- Kennedy, M.B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*. **290**(5492): 750–54. doi:10.1126/science.290.5492.750
- Kennedy, M.B., Beale, H.C., Carlisle, H.J., Washburn, L.R. (2005). Integration of biochemical signalling in spines. *Nature reviews. Neuroscience*. **6**(6): 423–34. doi:10.1038/nrn1685

- Kim, K., Yang, J., Zhong, X.-P., Kim, M.-H., Kim, Y.S., Lee, H.W., Han, S., Choi, J., Han, K., Seo, J., Prescott, S.M., Topham, M.K., Bae, Y.C., Koretzky, G., Choi, S.-Y., Kim, E. (2009). Synaptic removal of diacylglycerol by DGK ζ and PSD-95 regulates dendritic spine maintenance. *The EMBO Journal*. **28**(8): 1170–79. doi:10.1038/emboj.2009.44
- Knobloch, M., Mansuy, I.M. (2008). Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*. **37**(1): 73–82. doi:10.1007/s12035-008-8018-z
- Korobova, F., Svitkina, T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*. **21**:165-176. doi: 10.1091/mbc.e09-07-0596
- Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J.C., Goehring, A., Du, J., Song, X., Gouaux, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*. **511**(7508): 191–97. doi:10.1038/nature13548
- Li, G., Wang, Y. (2014). Protein kinase D: A new player among the signaling proteins that regulate functions in the nervous system. *Neuroscience Bulletin*. **30**(3): 497–504. doi:10.1007/s12264-013-1403-2
- Li, G.H., Jackson, M.F., Orser, B.A., MacDonald, J.F. (2010). Reciprocal and activity-dependent regulation of surface AMPA and NMDA receptors in cultured neurons. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. **2**(1): 47–56.
- Li, Z., Sheng, M. (2003). Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **4**(11): 833–41. doi:10.1038/nrm1242
- Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J., Malhotra, V. (2001). Protein Kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell*. **104**(3): 409–20. doi:10.1016/S0092-8674(01)00228-8
- Lin, W.H., Webb, D.J. (2009). Actin and actin-binding proteins: masters of dendritic spine formation, morphology, and function. *Open Neuoscience Journal*. **3**: 54–66. doi:10.2174/1874082000903020054
- Lonze, B.E., Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. **35**: 605-623. doi:10.1016/S0896-6273(02)00828-0

- Lu, W.Y., Man, H.Y., Ju, W., Trimble, W.S., MacDonald, J.F., Wang, Y.T. (2001). Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. **29**: 243–54. doi:10.1016/S0896-6273(01)00194-5
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiology Reviews*. **84**: 87-136. doi: 10.1152/physrev.00014.2003
- Lüscher, C., Malenka, R.C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP / LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4: 1–16. doi:10.1101/cshperspect.a005710
- MacAskill, A.F., Atkin, T.A., Kittler, J.T. (2010). Mitochondrial tracking and the provision of energy and calcium buffering at excitatory synapses. *European Journal of Neuroscience*. **32**(2): 231–40. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07345.x
- Matthews, S.A., Rozengurt, E., Cantrell, D. (1999). Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/protein kinase C μ . *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(37): 26543–49. doi:10.1074/jbc.274.37.26543
- Michalon, A., Koshibu, K., Baumgärtel, K., Spirig, D.H., Mansuy, I.M. (2005). Inducible and neuron-specific gene expression in the adult mouse brain with the rtTA2S-M2 system. *Genesis. (New York)* **43**(4): 205–12. doi:10.1002/gene.20175
- Mizuno, K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular Signalling*. **25**(2): 457–69. doi:10.1016/j.cellsig.2012.11.001
- Molnár, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **22**: 506–13. doi:10.1016/j.semcd.2011.07.017
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal Neuroscience Methods*. **11**(1):47-64. doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4
- Nhek, S., Ngo, M., Yang, X., Ng, M.M., Field, S.J., Asara, J.M., Ridgway, N.D., Toker, A. (2010). Regulation of oxysterol-binding protein Golgi localization through protein kinase D-mediated phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*. **21**:2327-2337. doi: 10.1091/mbc.e10-02-0090
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic

- spines. *Annual Review of Physiology*. **64**(1): 313–53. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.J., Songyang, Z., Cantley, L.C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(2): 952–60. doi:10.1074/jbc.272.2.952
- Niswender, C.M., Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual Reviews Pharmacology Toxicology*. **50**: 295–322. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- Oh, M.C., Derkach, V.A. (2005). Dominant role of the GluR2 subunit in regulation of AMPA receptors by CaMKII. *Nature Neuroscience*. **8**(7): 853–54. doi:10.1007/s10620-005-2652-3
- Okamoto, K.I., Nagai, T., Miyawaki, A., Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature Neuroscience*. **7**(10): 1104–12. doi:10.1038/nn1311
- Olayioye, M.A., Barisic, S., Hausser, A. (2013). Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D. *Cellular Signalling*. **25**(9): 1739–47. doi:10.1016/j.cellsig.2013.04.010
- Oliveira, A.M.M., Hawk, J.D., Abel, T., Havekes, R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & Memory. (Cold Spring Harbor, N.Y.)* **17**(3): 155–60. doi:10.1101/lm.1625310
- Oster, H., Abraham, D., Leitges, M. (2006). Expression of the protein kinase D (PKD) family during mouse embryogenesis. *Gene Expression Patterns*. **6**: 400–408. doi:10.1016/j.modgep.2005.09.006
- Pandey, K., Sharma, K.P., Sharma, S.K. (2015). Histone deacetylase inhibition facilitates massed pattern-induced synaptic plasticity and memory. *Learning & Memory. (Cold Spring Harbor, N.Y.)* **22**(10): 514–18. doi:10.1101/lm.039289.115
- Pang, P.T., Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: Role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Research Reviews*. **3**(4): 407–30. doi:10.1016/j.arr.2004.07.002
- Pantaloni, D. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science*. **292**(5521): 1502–6.

doi:10.1126/science.1059975

- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience*. **14**(6): 383–400. doi:10.1038/nrn3504
- Park, M., Salgado J.M., Ostroff, L., Helton, T.D., Robinson, C.G., Harris, K.M., Ehlers, M.D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*. **52**(5): 817–30. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.040
- Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., VanLeeuwen, J.-E., Woolfrey, K.M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*. **14**(3): 285–93. doi:10.1038/nn.2741
- Pérez-Otaño, I., Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends in Neurosciences*. **28**(5): 229–38. doi:10.1016/j.tins.2005.03.004
- Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *The American Journal of Anatomy*. **127**(4): 321–55. doi:10.1002/aja.1001270402
- Pollard, T.D., Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. **112**(4): 453–65. doi:10.1016/S0092-8674(03)00120-X
- Prut, L., Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. **463**(1-3): 3–33. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X
- Quassollo, G., Wojnacki J., Salas, D.A., Gastaldi, L., Marzolo, M.P., Conde, C., Bisbal, M., Couve, A., Cáceres, A. (2015). A RhoA signaling pathway regulates dendritic Golgi outpost formation. *Current Biology*. **25**(8): 971–82. doi:10.1016/j.cub.2015.01.075
- Quinlan, E.M., Halpain, S. (1996). Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors. *Neuron*. **16**: 357–68. doi:10.1016/S0896-6273(00)80053-7
- Ramón y Cajal, S. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm. Pat.* **1**:1–10.

- Ramón y Cajal, S. (1896a). Le bleu de methylene dans les centres nerveaux. *Rev. Trim. Microgr.* **1**:21–82.
- Racz, B., Weinberg, R.J. (2006). Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience*. **138**(2): 447–56. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.11.025
- RÁCZ, B., Weinberg, R.J. (2008). Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines. *The Journal of Neuroscience*. **28**(22): 5654–59. doi:10.1523/JNEUROSCI.0756-08.2008
- RÁCZ, B., Weinberg, R.J. (2013). Microdomains in forebrain spines: an ultrastructural perspective. *Molecular Neurobiology*. **47**(1): 77–89. doi:10.1007/s12035-012-8345-y
- Rebbecki, M.J., Pentyala, S.N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiology Review*. **80**(4): 1291-335.
- Regehr, W.G., Carey, M.R., Best, A.R. (2009). Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron*. **63**(2): 154–70. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.021
- Rey, O., Sinnott-Smith, J., Zhukova, E., Rozengurt, E. (2001). Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**(52): 49228–35. doi:10.1074/jbc.M109395200
- Rozengurt, E. (2011). Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology. (Bethesda, Md.)* **26**(1): 23–33. doi:10.1152/physiol.00037.2010
- Rozengurt, E., Rey, O., Waldron, R.T. (2005). Protein kinase D signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**(14): 13205–8. doi:10.1074/jbc.R500002200
- Rust, M.B., Gurniak, C.B., Renner, M., Vara, H., Morando, L., Görlich, A., Sassoè-Pognetto, M., Al-Banchaabouchi, M., Giustetto, M., Triller, A., Choquet, D., Witke, W. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *The EMBO Journal*. **29**(11): 1889–1902. doi:10.1038/emboj.2010.72
- Rybin, V.O., Guo, J., Steinberg, S.F. (2009). Protein kinase D1 autophosphorylation via distinct mechanisms at Ser744/Ser748 and Ser916. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(4): 2332–43. doi:10.1074/jbc.M806381200
- Sánchez-Ruiloba, L., Aicart-Ramos, C., García-Guerra, L., Pose-Utrilla, J., Rodríguez-Crespo, I., Iglesias, T. (2014). Protein kinase D interacts with neuronal nitric oxide synthase and

- phosphorylates the activatory residue serine 1412. *PloS ONE*. **9**(4): e95191. doi:10.1371/journal.pone.0095191
- Sánchez-Ruiloba, L., Cabrera-Poch, N., Rodríguez-Martínez, M., López-Menéndez, Jean-Mairet, R.M., Higuero, A.M., Iglesias, T. (2006). Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**(27): 18888–900. doi:10.1074/jbc.M603044200
- Sarnat, H.B., Netsky, M.G. (1985). The brain of the planarian as the ancestor of the human brain. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. **12**(4): 296–302.
- Schmidt, M.R., Haucke, V. (2007). Recycling endosomes in neuronal membrane traffic. *Biology of the Cell*. **99**(6): 333–42. doi:10.1042/BC20070007
- Sharma, S., Rakoczy, S., Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*. **87**(17-18): 521-36. doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.004
- Sheng, M., Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *The Journal of Cell Science*. **113**: 1851–56.
- Sheng, M., Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **1**(3): 12 doi:10.1101/cshperspect.a005678
- Shepherd, G.M., Harris, K.M. (1998). Three-dimensional structure and composition of CA3->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. *The Journal of Neuroscience*. **18**(20): 8300–8310.
- Shiraishi-Yamaguchi, Y., Furuichi, T. (2007). The Homer family proteins. *Genome Biology*. **8**(2): 206. doi:10.1186/gb-2007-8-2-206
- Simms, B.A., Zamponi, G.W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*. **82**(1): 24–45. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.016
- Spacek, J., Harris, K.M. (1997). Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *The Journal of Neuroscience*. **17**(1): 190–203
- Spiering, D., Hodgson, L. (2011). Dynamics of the rho-family small GTPases in actin

- regulation and motility. *Cell Adhesion and Migration*. **5**(2): 170–80. doi:10.4161/cam.5.2.14403
- Spratley, S.J., Bastea, L.I., Döppler, H., Mizuno, K., Storz, P. (2011). Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(39): 34254–61. doi:10.1074/jbc.M111.259424
- Steinberg, S.F. (2012). Regulation of protein kinase D1 activity. *Molecular Pharmacology*. **81**(3): 284–91. doi:10.1124/mol.111.075986
- Steward, O., Reeves, T.M. (1988). Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *The Journal of Neuroscience*. **8**(1): 176–184.
- Storz, P., Döppler, H., Toker, A. (2005). Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biology*. **25**(19): 8520–30. doi:10.1128/MCB.25.19.8520
- Sturany, S., Van Lint, J., Müller, F., Wilda, M., Hameister, H., Höcker, M., Brey, A., Gern, U., Vandenheede, J., Gress, T., Adler, G., Seufferlein, T. (2001). Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2: a novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**(5): 3310–18. doi:10.1074/jbc.M008719200
- Sundram, V., Chauhan, S.C., Jaggi, M. (2011). Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. *Molecular Cancer Research*. **9**(8): 985–96. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0365
- Südhof, T.C. (2008). Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*. **455**(7215): 903–11. doi:10.1038/nature07456
- Südhof, T.C., Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **3**(12): 1–14. doi:10.1101/cshperspect.a005637
- Tárnok, K., Gulyás, M., Bencsik, N., Ferenc, K., Pfizenmaier, K., Hausser, A., Schlett, K. (2015). A new tool for the quantitative analysis of dendritic filopodial motility. *Cytometry Part A*. **87**(1): 89–96. doi:10.1002/cyto.a.22569
- Tackenberg, C., Ghori, A., Brandt, R. (2009). Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. **6**(3): 261–68.

doi:10.2174/156720509788486554

- Tai, H.C., Schuman, E. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*. **9**(11): 826–38. doi:10.1038/nrn2499
- Tatavarty, V., Das, S., Yu, J. (2012). Polarization of actin cytoskeleton is reduced in dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron. *Molecular Biology of the Cell*. **23**(16): 3167–77. doi:10.1091/mbc.E12-02-0165
- Tolman, E.C., Gleitman, H. (1949). Studies in spatial learning; place and response learning under different degrees of motivation. *Journal of Experimental Psychology*. **39**(5): 653–59. doi:10.1037/h0059317
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacology Reviews*. **62**:405-496. doi:10.1124/pr.109.002451
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: From mind to brain. *Annual Review Psychology*. **53**:1-25. doi:10.1146/annurev.psych.53.100901.135114
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*. **391**(6670): 892–96. doi:10.1038/36103
- Turrigiano, G.G., Nelson, S.B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. **10**(3):358-64. doi:10.1016/s0959-4388(00)00091-x
- Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J., Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**(18): 8572–76. doi:10.1073/pnas.91.18.8572
- Vertommen, D., Rider, M., Ni, Y., Waelkens, E., Merlevede, W., Vandenheede, J.R., Van Lint, J. (2000). Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**(26): 19567–76.

doi:10.1074/jbc.M001357200

- Voglis, G., Tavernarakis, N. (2006). The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Reports*. **7**(11): 1104–10. doi:10.1038/sj.embor.7400830
- Volterra, A., Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature reviews. Neuroscience*. **6**(8): 626–40. doi:10.1038/nrn1722
- Wang, N., Su, P., Zhang, Y., Lu, J., Xing, B., Kang, K., Li, W., Wang, Y. (2014). Protein kinase D1-dependent phosphorylation of dopamine D1 receptor regulates cocaine-induced behavioral responses. *Neuropsychopharmacology*. 1–12. doi:10.1038/npp.2013.341
- Wang, Q.J. (2006). PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*. **27**(6): 317–23. doi:10.1016/j.tips.2006.04.003
- Wang, Y., Waldron, R.T., Dhaka, A., Patel, A., Riley, M.M., Rozengurt, E., Colicelli, J. (2002). The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Molecular and Cellular Biology*. **22**(3): 916–26. doi:10.1128/MCB.22.3.916-926.2001
- Wegner, A.M., Nebhan, C.A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K.M., Weaver, A.M., Webb, D.J. (2008). N-WASP and the Arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(23): 15912–20. doi:10.1074/jbc.M801555200
- Wu, H.-Y., Hudry, E., Hashimoto, T., Kuchibhotla, K., Rozkalne, A., Fan, Z., Spires-Jones, T., Xie, H., Arbel-Ornath, M., Grosskreutz, C.L., Bacskaï, B.J., Hyman, B.T. (2010). Amyloid β induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *The Journal of Neuroscience*. **30**(7): 2636–49. doi:10.1523/jneurosci.4456-09.2010
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. **419**: 35–42. doi:10.1038/nature00978
- Yoshihara, Y., De Roo, M., Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion Neurobiology*. **19**(2): 146–53. doi:10.1016/j.conb.2009.05.013
- Yuste, R. (2010). Dendritic spines. *MIT Press, Cambridge*
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000093/full>

- Yuste, R. (2015). The discovery of dendritic spines by Cajal. *Frontiers in Neuroanatomy*. **9**: 18. doi:10.3389/fnana.2015.00018
- Ziegler, S., Eiseler, T., Scholz, R.-P., Beck, A., Link, G., Hausser, A. (2011). A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration. *Molecular Biology of the Cell*. **22**(5): 570–80. doi:10.1091/mbc.E10-05-0427
- Zigmond, S.H., Evangelists, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A.C., Sicheri, F., Forkey, J., Pring, M. (2003). Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Current Biology*. **13**(20): 1820–23. doi:10.1016/j.cub.2003.09.057

12. A szerző publikációi

A témában megjelent tudományos közlemények:

- Bencsik, N., Szíber, Zs., Liliom, H., Tárnok, K., Borbély, S., Gulyás, M., Rátkai, A., Szűcs, A., Hazai-Novák, D., Ellwanger, K., Rácz, B., Pfizenmaier, K., Hausser, A., Schlett, K.
Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation.
The Journal of Cell Biology. **210**(5): 771-783. (2015). doi:10.1083/jcb.201501114 (IF:8,717)
- Tárnok, K., Gulyás, M., Bencsik, N., Ferenc, K., Pfizenmaier, K., Hausser, A., Schlett, K.
A new tool for the quantitative analysis of dendritic filopodial motility.
Cytometry Part A. **87**(1): 89-96. (2015). doi:10.1002/cyto.a.22569 (IF:3,181)
- Gulyás, M., Bencsik, N., Pusztai, S., Liliom, H., Schlett, K.
AnimalTracker: an ImageJ-based tracking API to create customized behavioural analyser program.
Neuroinformatics. **14**(4): 479-481. (2016). doi:10.1007/s12021-016-9303-z (IF:2,864)

Nem a témában megjelent tudományos közlemények:

- Szigeti, Cs., Bencsik, N., Simonka, J.A., Légrádi, Á., Kása, P., Gulya, K.
Long-term effects of selective immunolesions of cholinergic neurons of the nucleus basalis magnocellularis on the ascending cholinergic pathways in the rat: A model for Alzheimer's disease.
Brain Research Bulletin. **94C**: 9-16. (2013). doi:10.1016/j.brainresbull.2013.01.007 (IF:2,974)

Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation

Norbert Bencsik,¹ Zsófia Szíber,¹ Hanna Liliom,¹ Krisztián Tárnok,¹ Sándor Borbély,¹ Márton Gulyás,² Anikó Rátkai,¹ Atila Szűcs,² Diána Hazai-Novák,³ Kornelia Ellwanger,⁴ Bence Rácz,³ Klaus Pfizenmaier,⁴ Angelika Hausser,⁴ and Katalin Schlett^{1,2}

¹Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Loránd University, H-1117 Budapest, Hungary

²MTA-ELTE-NAP B Neuronal Cell Biology Research Group, H-1117 Budapest, Hungary

³Department of Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Science, Szent István University, H-1400 Budapest, Hungary

⁴Institute of Cell Biology and Immunology, University of Stuttgart, D-70569 Stuttgart, Germany

Actin turnover in dendritic spines influences spine development, morphology, and plasticity, with functional consequences on learning and memory formation. In nonneuronal cells, protein kinase D (PKD) has an important role in stabilizing F-actin via multiple molecular pathways. Using *in vitro* models of neuronal plasticity, such as glycine-induced chemical long-term potentiation (LTP), known to evoke synaptic plasticity, or long-term depolarization block by KCl, leading to homeostatic morphological changes, we show that actin stabilization needed for the enlargement of dendritic spines is dependent on PKD activity. Consequently, impaired PKD functions attenuate activity-dependent changes in hippocampal dendritic spines, including LTP formation, cause morphological alterations *in vivo*, and have deleterious consequences on spatial memory formation. We thus provide compelling evidence that PKD controls synaptic plasticity and learning by regulating actin stability in dendritic spines.

Introduction

Excitatory inputs in the brain mainly target dendritic spines, which are small actin-rich protrusions formed along neuronal dendrites. It is now widely accepted that synaptic plasticity and memory formation modify the morphology of dendritic spines, including the appearance of new protrusions, as well as rearrangement of already existing synaptic connections (reviewed in Holtmaat and Svoboda (2009) and Yuste (2010)).

The cytoskeleton in spines is formed predominantly by F-actin and serves both as a structural framework to maintain shape and as the principal regulator of protein and vesicular trafficking (Frost et al., 2010; Bosch and Hayashi, 2012). Previous studies have shown that F-actin is highly dynamic in spines (Star et al., 2002; Okamoto et al., 2004) and is regulated by a plethora of signaling pathways (Pontrello and Ethell, 2009; Penzes and Cahill, 2012). Depending on the modulation of input activity or homeostatic regulation, spines can undergo structural changes, e.g., enlargement during long-term potentiation (LTP) or shrinkage during long-term depression, with strict temporal and spatial regulations of actin turnover (Bosch and Hayashi, 2012).

The PKD family of serine/threonine kinases comprises three isoforms in mammals (PKD1–3). PKDs are activated

by members of the novel PKC family and are recruited to the plasma membrane or intracellular membranes via binding DAG to achieve full activation (Steinberg, 2012). Activated PKDs can exert various cellular functions, including the regulation of cell motility and invasion (LaValle et al., 2010b; Olayioye et al., 2013). In nonneuronal tumor cells, PKD activity suppresses cell motility by controlling actin dynamics via Slingshot (SSH1), p21-activated kinase 4 (PAK4), or cortactin (reviewed in Olayioye et al. (2013) and references therein).

In the rodent brain, all three PKD isoforms are expressed early in embryonal development (Oster et al., 2006). So far, neuronal PKD activity has been shown to affect dendrite development and maintenance, intracellular transport, and Golgi functions, as well as modulation of transmembrane receptors (Cabrera-Poch et al., 2004; Horton et al., 2005; Bisbal et al., 2008; Czöndör et al., 2009; Wang et al., 2014; Quassollo et al., 2015). In this work, we investigated PKD-mediated effects on dendritic spines and the consequences of altered PKD activity upon evoking different forms of neuronal plasticity and memory formation. We show that endogenous PKDs regulate activity-dependent changes in dendritic spines by regulating F-actin

Correspondence to Katalin Schlett: schlett@ludens.elte.hu

Abbreviations used in this paper: cLTP, chemical LTP; DI, discrimination index; DOX, doxycycline; EPSP, excitatory postsynaptic potential; HFS, high-frequency stimulation; LTP, long-term potentiation; MF, mossy fiber; POPS, population spike; PSD, postsynaptic density; ROI, region of interest; SC, Schaffer collateral.

© 2015 Bencsik et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2015/08/20/jcb.201501114.DC1.html>

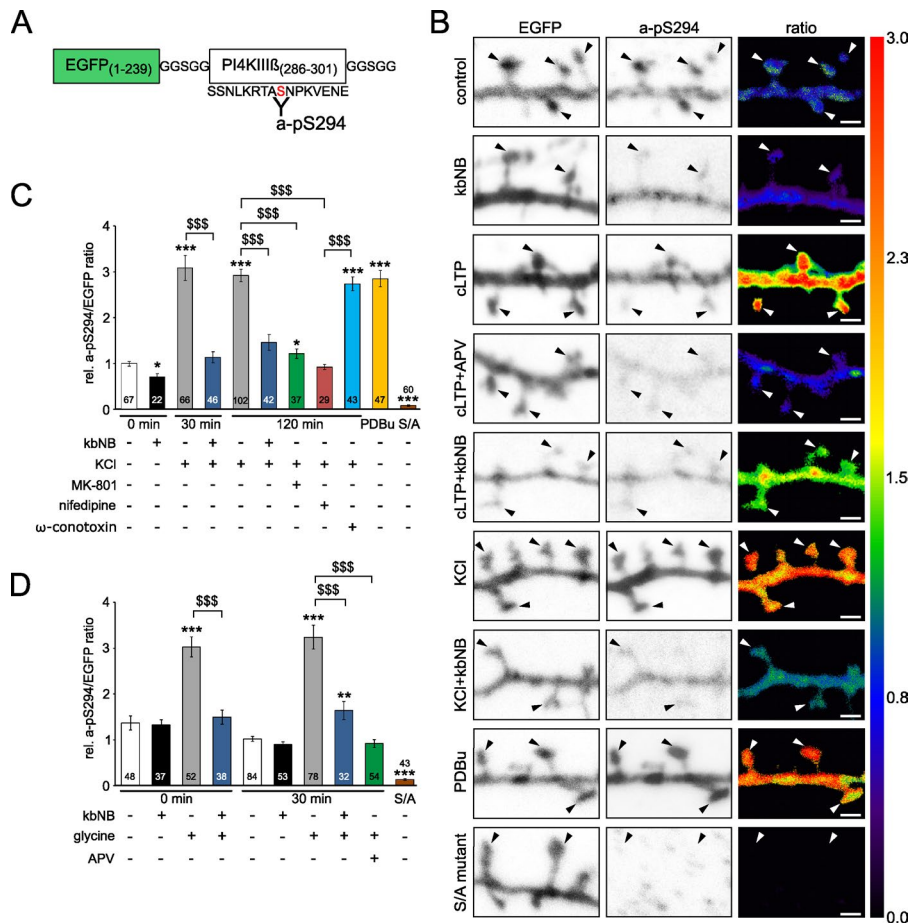


Figure 1. Endogenous PKD is activated within dendritic spines during plasticity-inducing changes in vitro. (A) Schematic representation of the PKD activity reporter, containing the PKD-specific substrate sequence of phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ (PI4KIIIβ) and the EGFP sequence. The a-pS294 antibody recognizes the phosphorylated Ser294 target site. (B) Inverted fluorescent and a-pS294/EGFP ratio images of tertiary dendritic branches from control or cLTP- or KCl-treated neurons after 30 min. Arrowheads indicate mushroom spines. Bars, 1 μm. (C and D) Relative a-pS294/EGFP ratio values in mushroom spines treated with KCl (C) or cLTP (D) for the indicated time. 3 μM kbNB 142-70 (kbNB) or 1 μM PDBu was applied 1 h before other treatments or for 15 min, respectively. 10 μM MK-801, 50 μM APV, 1 μM nifedipine, and 1 μM ω-conotoxin MVIIC were applied for the indicated time periods. S/A indicates a reporter construct with a nonphosphorylatable alanine mutation. Data were obtained from three to four independent cultures and displayed as mean ± SEM. The number of analyzed spines is indicated within the graphs. Asterisks represent significance compared with control values, and \$ symbols indicate significant differences between data pairs. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, or \$\$\$, *P* < 0.001.

consolidation and provide compelling evidence that PKD activity is required for proper learning and memory formation.

Results

Endogenous PKD is active in dendritic spines

Previously, we have described a PKD activity reporter, which is suitable to visualize endogenous PKD-mediated phosphorylation events in fixed cells (Fig. 1 A; Czöndör et al., 2009; Fuchs et al., 2009) and is present in the dendritic branches and spines of DIV12-13 hippocampal neurons (see the EGFP signal in Fig. 1 B and Fig. S1 A). To compare the extent of reporter phosphorylation in spines, ratiometric images were created by normalizing the a-pS294 to EGFP signal intensities (Fig. 1 B and Fig. S1 A, ratio images). Only mushroom spines with clearly enlarged heads were chosen for the analysis. To confirm the specificity of the pS294 antibody signal, a mutant reporter construct containing alanine instead of the target serine was also investigated (S/A mutant). In all cases, S/A mutant reporter displayed only a negligible ratio signal (Fig. 1, B–D).

In untreated cells, phosphorylation of the PKD reporter was moderate and strongly increased by phorbol ester treatment (PDBu; Fig. 1, B and C). To inhibit endogenous PKD activity in neurons, which express all PKD isoforms, we applied the selective PKD inhibitor kbNB 142-70, which inhibits all three PKD isoforms at nanomolar concentrations and blocks PKD-mediated actions in vitro, whereas it is ineffective against other ki-

nases in concentrations below 10 μM (LaValle et al., 2010a; Bravo-Altamirano et al., 2011; Ni et al., 2013). Application of 3 μM kbNB 142-70 significantly reduced the phosphorylation of the reporter compared with control cells (Fig. 1, B and C), indicating endogenous PKD activity within mushroom spines under basal conditions. Remarkably, kbNB 142-70 effectively inhibited PKD activity reporter phosphorylation in HEK293T cells and did not show toxic effects on embryonic cortical neuronal cultures in the applied concentration (Fig. S2, A–D).

Chemical treatments evoking different forms of plasticity activate PKD within dendritic spines

To investigate whether PKD-dependent mechanisms play a role in spine rearrangements, different chemical treatments were applied to hippocampal cultures. Glycine-induced chemical LTP (cLTP) is known to transiently activate NMDA receptors, leading to the strengthening of excitatory connections and spine enlargement within 1 h after stimulus (Lu et al., 2001; Goldin et al., 2001). In our hands, spine expansion occurred after 30 min and lasted for at least 2 h after cLTP induction (not depicted). Phosphorylation of the reporter in dendritic spines was strongly elevated at 5 min and sustained for at least 30 min after glycine treatment (Fig. 1, B and D).

Long-term depolarization leads to homeostatic regulation of structural and functional plasticity within neurons (Grubb and Burrone, 2010). Neurons were treated with 20 mM KCl, whereas 20 mM NaCl was added to the control cultures to compensate for osmotic changes. Excess KCl rapidly depolarized

the neurons (from -54.6 ± 0.9 mV resting potential [$n = 27$; mean \pm SEM] to -28.8 ± 0.9 mV [$n = 3$]), silenced spontaneous neuronal activity, and prevented the formation of action potentials (Fig. S1 D), unless recorded neurons were hyperpolarized by injecting -200 pA negative current (Fig. S1 E). Despite this depolarization block, 16 h of KCl treatment did not affect the number of surviving neurons (Fig. S1 C). When KCl was washed out from the cultures, resting membrane potential rapidly returned to normal values (-49.7 ± 1 mV; $n = 26$) and neurons regained their normal activity, including the generation of single and burst-like spikes or receiving excitatory and inhibitory postsynaptic potentials (EPSPs and IPSPs, respectively; Fig. S1, F and G). Of note, 2 and 16 h of KCl treatment slightly increased cell viability in the cultures (Fig. S1 H).

KCl treatment activated PKD in the dendritic spines within 30 min, lasting for at least 2 h (Fig. 1, B and C) and with a uniform distribution along the axis of mushroom spines (Fig. S1, A and B). This effect was also evident at the culture level, as depolarization induced a long-lasting autophosphorylation of PKD on Ser910 (Fig. 2 C).

The PKD-specific inhibitor kbNB 142-70 blocked chemically induced reporter phosphorylation in both plasticity models (Fig. 1, B–D). Both MK-801 and APV, a noncompetitive and a competitive antagonist of NMDA receptors, respectively, reduced chemically induced reporter phosphorylation significantly (Fig. 1, B–D). It was reported that depolarization-induced homeostatic plasticity is regulated by the activation of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels (Grubb and Burrone, 2010; Evans et al., 2013). In accordance, blocking L-type Ca^{2+} channels by 1 μM nifedipine completely prevented KCl-induced PKD reporter phosphorylation, whereas ω -conotoxin MVIIC (blocking N-, P-, and Q-type Ca^{2+} channels) proved to be ineffective (Fig. 1 C). Thus, our data indicate that elevated intracellular Ca^{2+} signal plays a role in the activation of PKD-dependent signaling pathways within dendritic spines.

Actin turnover within dendritic spines occurs in a biphasic manner during chemically induced plasticity

During structural and functional plasticity, the actin cytoskeleton rapidly reorganizes to allow the elaboration of the F-actin network, leading to the expansion of the spine head during LTP (Bosch et al., 2014). These events depend greatly on ADF/cofilin's actin-severing activity, increasing barbed ends of actin filaments, and providing the basis for the formation of a more complex network (Mizuno, 2013).

Cofilin activity is inhibited by its phosphorylation on Ser3, which is governed by LIMK1/2 and TESK, whereas dephosphorylation by the slingshot (SSH) phosphatase family activates cofilin (Mizuno, 2013). For cLTP treatment, overall p-cofilin level within the cultures increased significantly only after 120 min of glycine treatment (Fig. 2 A). Interestingly, in parallel with an increase in pS910 autophosphorylation of PKD (Fig. 2 C), p-cofilin level was transiently reduced within the neuronal cultures during the initial 16 h of KCl application (Fig. 2 B).

To analyze cofilin phosphorylation and actin polymerization specifically within dendritic spines, we identified spine heads by PSD95 immunostaining and quantified the intensity of phosphorylated cofilin signal (Fig. 2, D–F), as well as actin-rhodamine incorporation within PSD95-positive dendritic spines (Fig. 2, G–I). Both cLTP and depolarization changed Ser3 phosphorylation of cofilin in a biphasic manner

(Fig. 2, D–F). Relative p-cofilin intensity was reduced within PSD95-positive dendritic spine heads at 30 min and 2 h of cLTP or KCl treatment, respectively (Fig. 2, E and F). As compared with the Western blot data, these results more specifically indicate that cofilin is active within dendritic spines at these time points. At later stages, however, p-cofilin signal significantly increased within investigated spines (Fig. 2, E and F; 120 min and 16 h of cLTP and KCl treatment, respectively). At the same time, the actin barbed end assay indicated a significant decrease in actin incorporation within dendritic spines in KCl-induced depolarization compared with control cells (Fig. 2, H and I).

16 h of KCl-induced depolarization significantly increased the ratio of mushroom spines (Fig. 3, A and C) without affecting spine density (not depicted). KCl-induced changes in spine morphology were also evident when individual spines were plotted according to their length and HN index (head/neck width ratio; Fig. 3 B). As this happened at the expense of thin, filamentous spines, we assume that long-term depolarization leads to F-actin stabilization and, consequently, the expansion of dendritic spine heads. Collectively, our data indicate decreased actin dynamics when enlarged dendritic spine heads are already stabilized.

Depolarization modulates PKD pathways regulating actin turnover in vitro

PKD can increase cofilin phosphorylation by inhibition of SSH1 (Ser978) and activation of the PAK4 (Ser474)-LIMK1 pathway (see Olayioye et al. (2013) as a review). Thus, increased PKD activity shifts the balance toward inactive cofilin, leading to decreased actin binding and the inhibition of its actin-severing activity, thereby slowing down depolymerization and stabilizing the F-actin pool. Accordingly, specific inhibition of endogenous PKD activity by kbNB 142-70 decreased p-cofilin immunostaining (Fig. 2, E and F) and enhanced actin turnover within dendritic spines as revealed by the barbed end assay (Fig. 2, G and H). Importantly, kbNB 142-70 effectively blocked plasticity-induced F-actin stabilization in both chemical plasticity models, indicating that elevated PKD activity was required to sustain spine enlargement.

To assess the relation between PKD activity and the phosphorylation level of its substrates, we analyzed pPAK4 and pSSH1 signals upon KCl treatment. As the available antibodies were not suitable for the immunostaining of dendritic spines, we performed Western blot analyses without and with PKD inhibition (Fig. S2, E and H). Application of kbNB 142-70 reduced relative PAK4 and SSH1 phosphorylation compared with signal intensities obtained from time-matched DMSO-only treated samples, supporting that they are indeed downstream targets of PKD in neuronal cultures (Fig. S2, E–H).

Depolarization-dependent morphological changes in dendritic spines require PKD activity

Long-term application of kbNB 142-70 in control cultures slightly but not significantly decreased the ratio of mushroom spines in EGFP-transfected neurons (Fig. 3, A–C), without dramatically affecting morphological parameters of individual spines (Fig. 3 B). When kbNB 142-70 was applied to 16-h KCl-induced cultures, pharmacological inhibition of PKD prevented the enlargement of spine heads and the morphological transformation from filamentous to mushroom spines (Fig. 3, A and C).

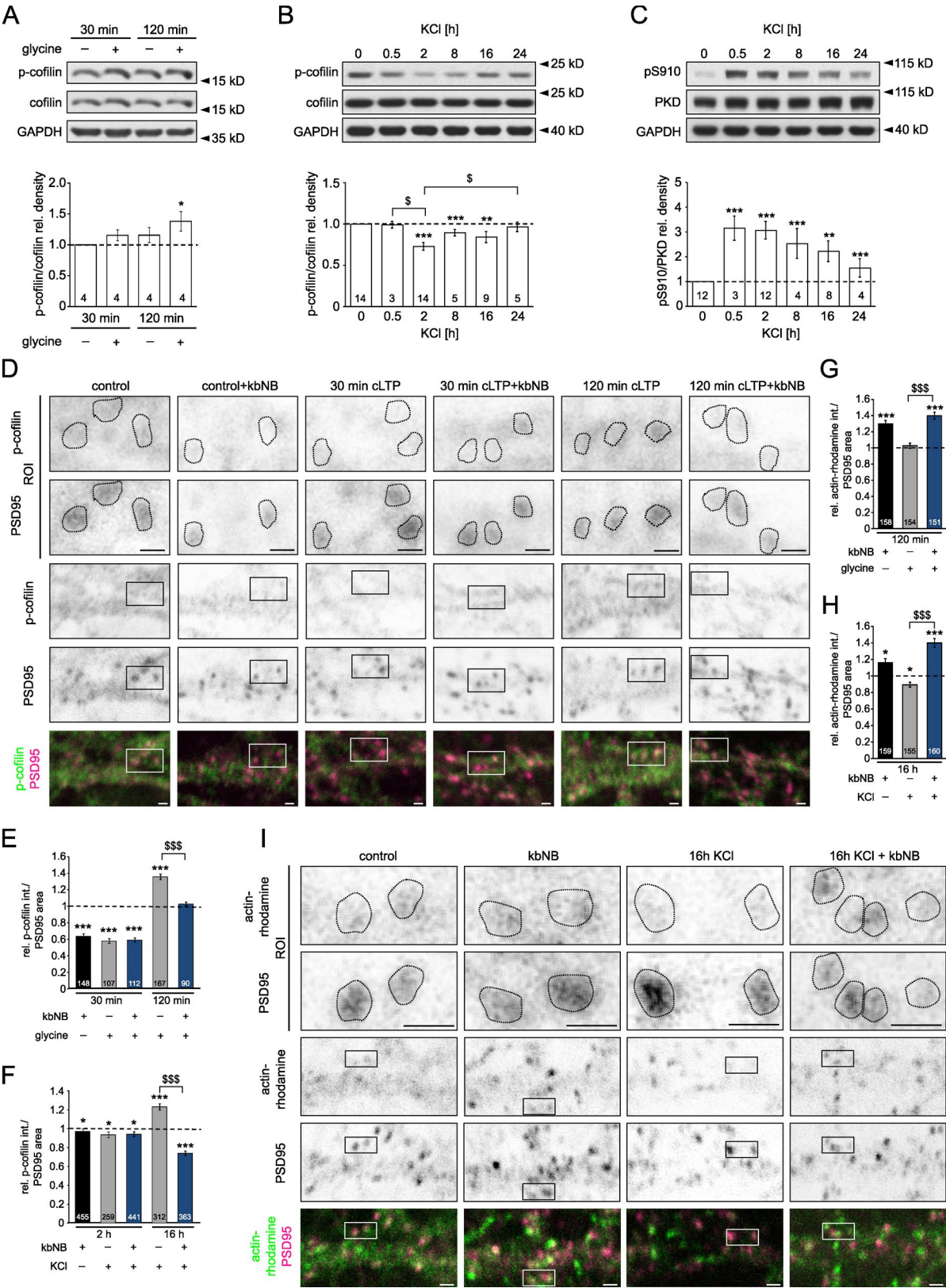


Figure 2. Actin dynamics during chemically induced plasticity is regulated in a PKD-dependent manner. (A and B) Relative changes in the Ser3 phosphorylation of cofilin during glycine-induced cLTP (A) or KCl-induced depolarization (B). (C) Temporal pattern of Ser910 phosphorylation of PKD during KCl-induced depolarization. Representative Western blots are displayed at the top. Graphs were calculated from 3–14 independent samples by normalizing phospho-specific/total protein/GAPDH ratios at the given time points to the nontreated values. (D) Inverted fluorescent and colored merged images of p-cofilin staining within PSD95-positive dendritic spines during cLTP treatment. The top rows show enlarged ROIs from the corresponding boxed areas in the lower-magnification images below. (E and F) Relative p-cofilin intensity values were normalized to the PSD area in cLTP (E)- or KCl (F)-treated cultures at the indicated time points. (G and H) Incorporation of actin-rhodamine during the stabilization of dendritic spines in cLTP (G)- or KCl (H)-treated

Mutation in the ATP-binding cassette of PKD1 (PKD1^{K612W}) inactivates the kinase and exerts a dominant-negative effect on all three isoforms (Czöndör et al., 2009; Rémillard-Labrosse et al., 2009; Ellwanger and Hausser, 2013). In accordance with pharmacological inhibition, expression of the EGFP-tagged dominant-negative PKD mutant (kdPKD-EGFP) reduced protrusion density in the tertiary branches of transfected neurons (Fig. 3, A and D) and increased the frequency of elongated, filamentous protrusions, along with a reduction of mushroom-shaped structures (Fig. 3 E). Dominant-negative kdPKD altered the remaining mushroom-shaped protrusions by decreasing their length and HN index, while significantly increasing the length of the thin spines (Fig. 3, F and G; Mann–Whitney *U* test, $P < 0.01$ for both types of spines). Thus, PKD activity plays a detectable role in F-actin stabilization during the later phase of depolarization, needed for sustaining enlarged spine heads in vitro.

Dominant-negative mutant PKD localizes to postsynaptic sites of hippocampal CA1 and CA3 neurons

To assess neuron-specific functions of PKD in vivo, we used a transgenic TetOn mouse line, allowing inducible expression of the dominant-negative kdPKD-EGFP protein (Czöndör et al., 2009). For better readability, doxycycline (DOX)-treated CaMKII α -rtTA2 \times kdPKD-EGFP double transgenic mice are named kdPKD-EGFP-expressing mice, whereas single transgenic littermates treated with DOX are referred to as the control group (Fig. 4, and Fig. 5, and Fig. S3).

In the case of 4–15 wk of DOX treatment, anti-GFP signal was detected only in kdPKD-EGFP-expressing mice, within the CA1 and CA3 regions of the hippocampus (Fig. 4, A and B; and Fig. 4, F and G, respectively), whereas other parts of the neocortex were negative or only scarcely labeled (not depicted). To visualize the subcellular localization of kdPKD-EGFP in these labeled neurons, electron micrographs were recorded from the CA1 stratum radiatum (Fig. 4, C–E) and from the CA3 stratum lucidum (Fig. 4, H and I). Because of the mosaic activation of rtTA2 in CaMKII α rtTA2 mice (Michalon et al., 2005), the expression pattern was not homogenous within the hippocampus, leaving some of the pyramidal neurons devoid of the mutant protein (see Fig. 4 C showing neighboring dendritic spines with and without the expression of kdPKD-EGFP).

Anti-GFP Ni-DAB immunoprecipitate was evident in the dendrites of pyramidal neurons (Fig. 4, A and F), as well as within dendritic spines (Fig. 4, C and H, black arrows). To more precisely localize the mutant protein within spines, pre-embedding anti-GFP immunogold immunohistochemistry was also performed (Fig. 4, D and E). Gold particles were found in the close vicinity of the plasma- and endomembranes (note a labeled putative spine apparatus in Fig. 4 D) and in the neighborhood of the postsynaptic density (PSD) area. These findings suggest that dominant-negative PKD mutant protein localizes at the postsynaptic regions of neurons and in the periphery of dendritic spines.

Inhibition of endogenous PKD activity leads to altered morphology and shrinkage of hippocampal dendritic spines in vivo

Next, we investigated how the inhibition of endogenous PKD activity affects in vivo morphology of dendritic spines in control and kdPKD-EGFP-expressing animals treated with DOX for 10–12 wk (Fig. 4, J–M). In control CA1 slices, long-term DOX treatment did not affect dendritic spine morphology and architecture as the strong correlation between spine area and PSD length (Pearson correlation coefficient $r = 0.72$) was highly similar to the linear correlation obtained from wild-type CA1 spines (Hazai et al., 2013). However, kdPKD-EGFP-expressing CA1 spines were significantly smaller (Fig. 4 L) and had shorter PSD in comparison with their total area (Pearson correlation coefficient significantly reduced to $r = 0.38$; $P < 0.001$; Fig. 4 J).

Mossy fibers (MFs) originating from the granule cells of the dentate gyrus formed giant, multiple synapses on the dendritic spines of CA3 pyramidal neurons in the stratum lucidum (Fig. 4, H and I). Although the correlation between the area and PSD length values was not significantly changed (Pearson coefficient was 0.48 and 0.43 for control and kdPKD-EGFP spines, respectively), spine area and PSD length were significantly reduced by kdPKD-EGFP expression (Fig. 4, K and M). Additionally, kdPKD-EGFP-expressing spines possessed a more elongated morphology, leading to a significantly reduced circularity index. Collectively, our data emphasize that the inhibition of endogenous PKD activity modifies spine morphology both in vivo and in vitro.

Expression of kdPKD-EGFP in the hippocampus leads to the selective impairment of hippocampus-dependent learning abilities

Smaller dendritic spines normally confer reduced synaptic transmission, which may influence network activity. Therefore, we compared the activity of control and kdPKD-EGFP-expressing animals in different behavioral tests. After 5 wk of DOX treatment, neither spatial preference and overall motor performance nor explorative behavior differed in the open field experiments (Fig. 5, A and B; and Fig. S3, A–E).

Novelty-recognizing learning abilities were tested by the novel object recognition test before the onset (0 wk) and during the 12th week of DOX treatment (Fig. 5 C). The discrimination index (DI) was calculated by comparing the time spent with the new object relative to the familiar object after a 5-h retention interval. Control and kdPKD-EGFP-expressing animals spent more time exploring the novel object, regardless of the duration of the DOX treatment. As the DI was not changed by long-term DOX treatment in either group of animals, we can rule out deteriorative changes in the animals induced by DOX itself.

Hippocampus-related spatial learning abilities were compared by the Morris water maze and the radial maze tests after 9 or 15 wk of DOX treatment, respectively. In the water maze test, control and kdPKD-EGFP-expressing animals swam with the same mean speed during probe trials (Fig. S3 F). Between

cultures. (I) Inverted fluorescent and colored merged images of actin-rhodamine incorporation within PSD95-positive dendritic spines during KCl treatment. The top rows show enlarged ROIs from the corresponding boxed areas in the lower-magnification images below. (D and I) Bars, 1 μ m. All data are displayed as mean \pm SEM, and numbers of analyzed samples are indicated within the graphs. Dashed lines within graphs indicate control values. Asterisks represent significance compared with control values, and the \$ symbol indicates significant differences between data pairs. * or \$, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; *** or \$\$\$, $P < 0.001$.

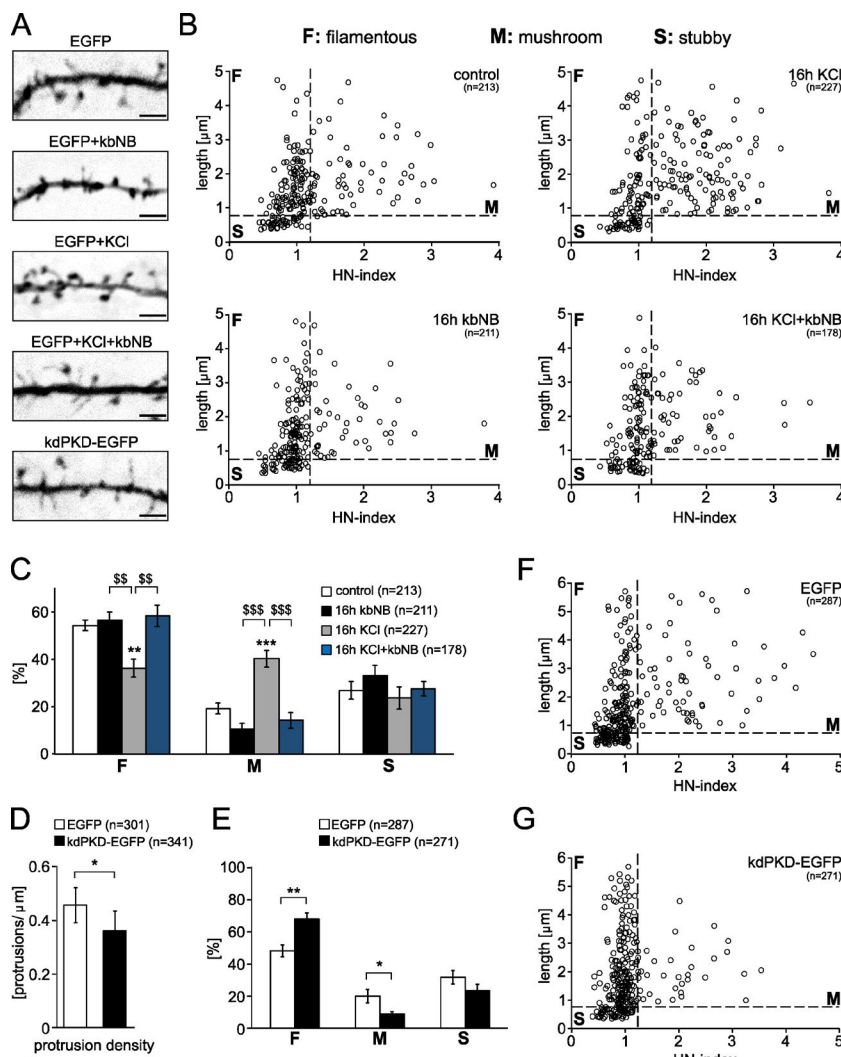


Figure 3. PKD activity regulates spine morphology in cultured neurons.

(A) Representative inverted fluorescent images of tertiary dendritic branches of EGFP-transfected neurons treated with 20 mM KCl and/or 3 μ M kbNB 142-70 or transfected with kdPKD-EGFP. Bars, 2 μ m. (B and C) Morphological characteristics of dendritic spines in EGFP-transfected neurons, plotted along their head/neck width ratio (HN index) and length (B) and mean proportion of filamentous, mushroom, or stubby spines upon 16 h of 20 mM KCl and/or 3 μ M kbNB 142-70 treatments (C). (D) Mean protrusion density on the tertiary branches of EGFP or kdPKD-EGFP-expressing neurons. (E) Mean proportion of filamentous, mushroom, or stubby spines in neurons transfected with EGFP or kdPKD-EGFP. (F and G) Morphological characteristics of dendritic spines in EGFP (F)- or kdPKD-EGFP (G)-transfected neurons, plotted along their head/neck width ratio (HN index) and length. Data were obtained from three to four independent cultures; the number of spines is indicated in the legends. All data are displayed as mean \pm SEM. Asterisks represent significance compared with control values (white columns), and the \$ symbol indicates significant differences between data pairs. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

the first (day 5) and second probe trials (day 10), control mice increased their searching activity for the removed platform as indicated by the elevated swim path and time spent over the target area (Fig. 5 E and Fig. S3 G). In contrast, kdPKD-EGFP-expressing mice performed significantly worse than controls on both days and were unable to improve their spatial memory even after 10 d of training. Fig. 5 D shows representative trajectories during the second probe trial.

In the eight-arm radial maze, the distance and time needed to find the baits positioned in every second arm were measured (Fig. 5 F and Fig. S3, H–L). The time spent in the center as well as in the baited and empty arms (Fig. S3, I and J), together with the number of entries into the baited or empty arms (Fig. S3, K and L), were also determined. Mean speed of control and kdPKD-EGFP mice was similar throughout the trials (12.4 ± 0.55 and 11.5 ± 0.77 cm/s, respectively). Animals performed similarly during the first week of the radial maze test. However, kdPKD-EGFP expression in the hippocampus prevented spatial learning during the second week of training. From the ninth day on, control animals ran significantly less and needed less time to find all four baits (Dunnett's post-hoc analysis, $P < 0.01$), whereas kdPKD-EGFP mice did not improve performance during the training sessions (Dunnett's post-hoc analysis, $P > 0.82$). Furthermore, kdPKD-EGFP-expressing mice spent significantly more time in the nonbaited arms and in the center

compared with the control group (Fig. S3, I and J). In parallel, the number of entries into the empty (nonbaited) arms was also significantly higher (Fig. S3, K and L). These findings imply that hippocampus-related spatial memory is impaired upon long-term expression of kdPKD-EGFP in the hippocampus.

Hippocampal LTP formation is reduced by kdPKD-EGFP expression

To provide a mechanistic explanation for the observed deficits in hippocampus-related learning tasks, electrophysiological recordings were performed on acute hippocampal slices of control and kdPKD-EGFP-expressing mice after 10 to 14 wk of DOX treatment. Field potential was recorded from the stratum pyramidale of the CA1 area by either stimulating Schaffer collaterals (SCs) or MFs (Fig. 5, G–L). The mean amplitude of population spikes (POPSs) was significantly higher in the case of SC stimulation compared with MF stimulation in both groups of animals (Fig. 5 G), which is explained by the direct, monosynaptic stimulation of CA1 neurons via SC inputs. When single SC or MF stimuli were applied, no differences were found in the general excitability of control or kdPKD-EGFP-expressing slices (Fig. 5 G). Accordingly, E/S curves displaying the ratio between the slope of the EPSP (dEPSP) and the POPS amplitude (Wheal et al., 1998) were similar before tetanization (Fig. 5 K).

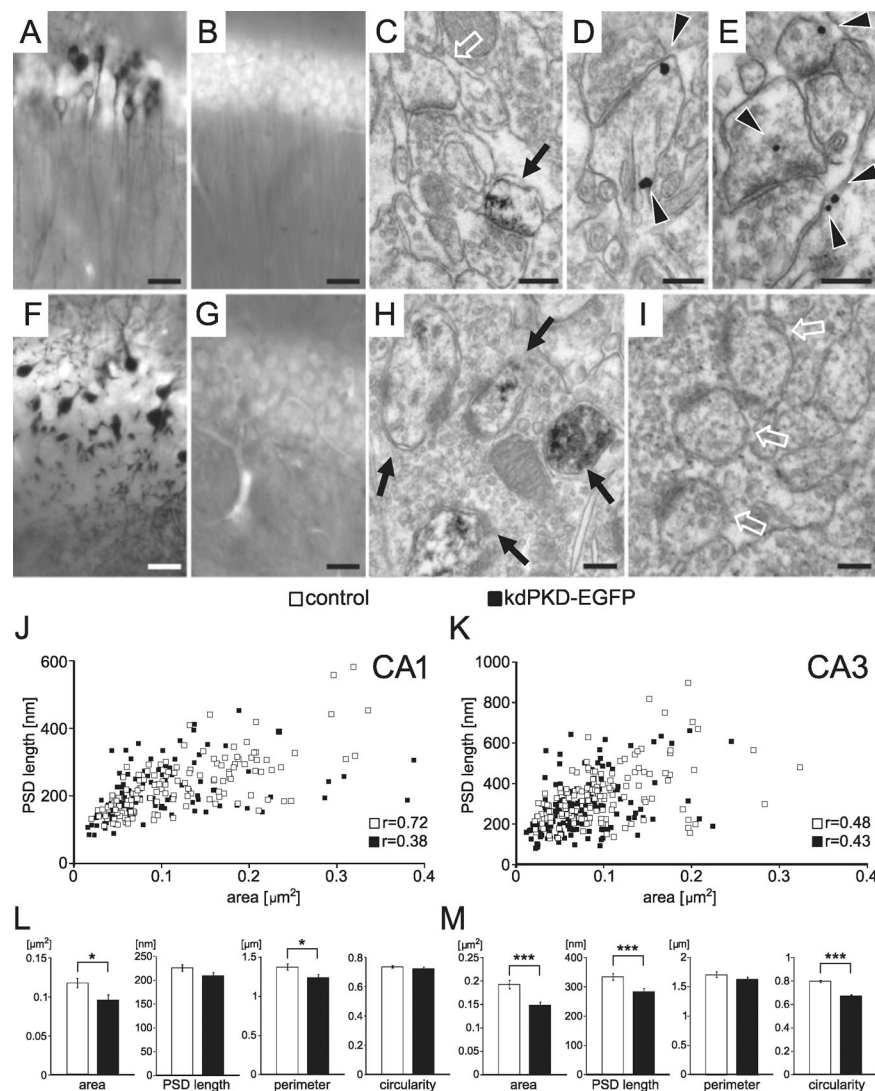


Figure 4. Expression of the dominant-negative kdPKD-EGFP mutant in double transgenic hippocampal neurons alters dendritic spine morphology in vivo. (A–I) α -EGFP staining in hippocampal CA1 (A–E) and CA3 (F–I) pyramidal neurons from kdPKD-EGFP-expressing (A, C–F, and H) or control mice (B, G, and I). (A, B, F, and G) Light microscopic DAB immunohistochemistry. (C, H, and I) Black arrows point to α -EGFP DAB precipitates in the dendritic spines of CA1 and CA3 dendrites, respectively. Nonlabeled spines are also present in the sections of kdPKD-EGFP mutant mice (white arrows in C and I). (D and E) Electron micrographs showing pre-embedded immunogold anti-GFP labeling (arrowheads) in the CA1 region. Bars: (A, B, F, and G) 30 μm ; (C–E, H, and I) 200 nm. (J–M) Quantitative evaluation of the dendritic spines in the CA1 (J and L; 144 control and 114 kdPKD-EGFP spines) and CA3 (K and M; 142 control and 153 kdPKD-EGFP spines) regions of control and kdPKD-EGFP-expressing hippocampus. Pearson correlation values between spine profile area and PSD length are indicated in J and K. Graphs represent mean \pm SEM. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

When high-frequency stimulation (HFS) was applied to the SCs, relative POPS amplitudes were enhanced in all cases, indicating the formation of LTP. However, 100-Hz tetanization in kdPKD-EGFP-expressing slices led to significantly reduced LTP compared with control slices (Fig. 5 I). For control slices, HFS induced robust facilitation as POPS amplitudes were larger for smaller dEPSP values. In contrast, facilitation was not detected when kdPKD-EGFP was expressed (Fig. 5 L). LTP in CA1 neurons was efficiently induced via a disynaptic transmission by the HFS of MFs, too, whereas kdPKD-EGFP-expressing neurons displayed a significantly impaired LTP compared with control slices (Fig. 5 J). These results are in line with the observed learning disabilities of kdPKD-EGFP-expressing mice and indicate that the lack of normal PKD functions within the CA1 and CA3 dendritic spines impairs synaptic plasticity.

Discussion

Although PKD has a well-established role in the regulation of the actin cytoskeleton and, consequently, cell migration or tumor metastasis in nonneuronal cells (see LaValle et al. (2010b) and Olayioye et al. (2013) as recent reviews), to our knowledge, our work is the first to address PKD-mediated effects on F-actin

organization within dendritic spines. Our in vitro models show that activity-induced plasticity of dendritic spines depends on proper PKD functions. PKD activity increases during chemically induced cellular plasticity in cultured neurons and is required for stabilizing the F-actin network within enlarged dendritic spines. Consequently, inhibition of PKD activity, either by a specific PKD inhibitor or by expression of a dominant-negative PKD mutant, blocks activity-dependent changes in hippocampal dendritic spines, including morphological alterations as well as LTP formation, with an impact on spatial memory formation. Thus, PKD activity regulates synaptic plasticity in spines by regulating actin turnover and stability.

Chemically induced dendritic spine rearrangements proceed through a biphasic change in actin dynamics and require PKD activity

To test the importance of endogenous PKD activity within dendritic spines, we applied chemical stimulations known to induce different forms of plasticity. On one hand, glycine-induced cLTP is a method to stimulate specifically NMDA receptors only at synapses receiving spontaneous release of glutamate; thus, it closely mimics stimulus-induced synaptic potentiation, leading to the fast redistribution of the F-actin

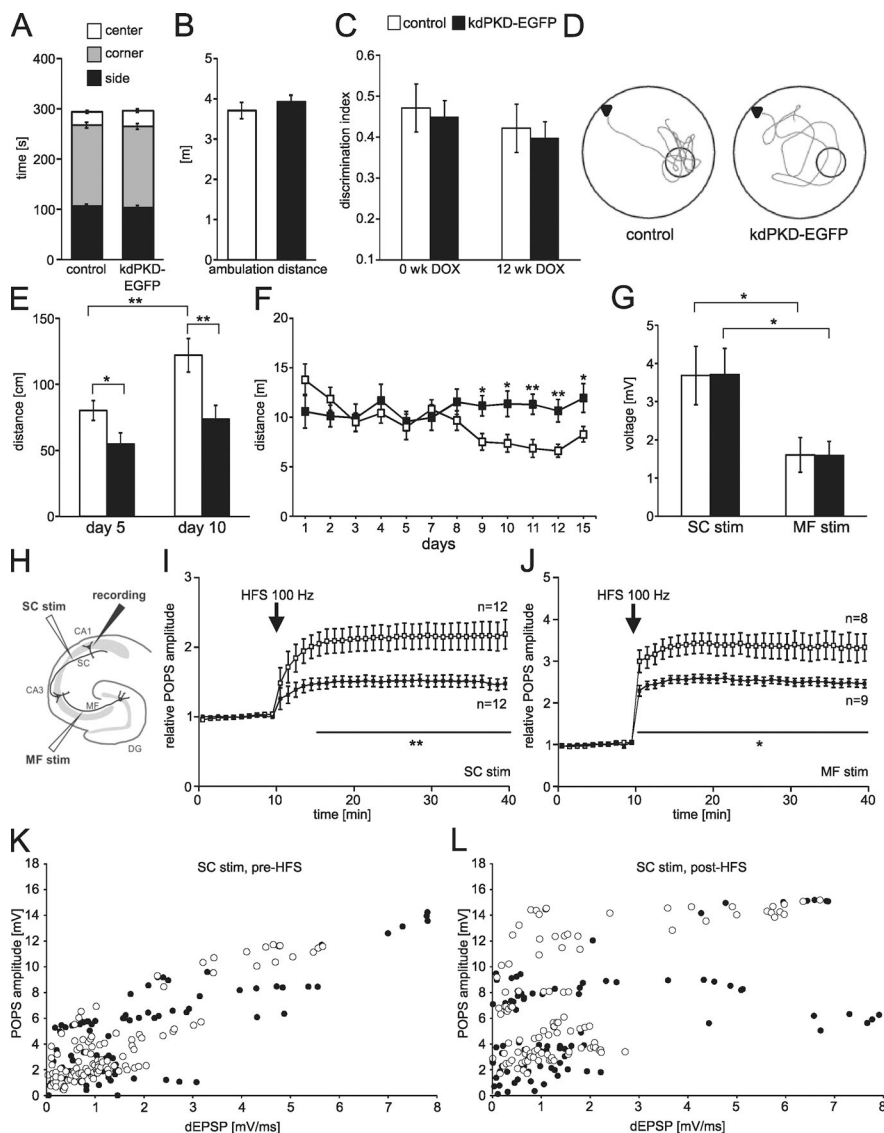


Figure 5. Inhibition of endogenous PKD activity in hippocampal pyramidal neurons selectively impairs spatial memory formation and reduces LTP in CA1 hippocampal neurons. Control ($n = 16$) and kdPKD-EGFP-expressing ($n = 16$) data are displayed by open and closed symbols and columns, respectively (B, C, and E–L). (A and B) Duration of time spent (A) and total running distance (B) within the open field. (C) Animals performed novel object recognition tests similarly before and during 12 wk of DOX. (D) Representative trajectories from control and kdPKD-EGFP-expressing mice during the second probe trial of the Morris water maze. Black triangles indicate start positions; the inner circles represent the target area over the original platform. (E) Distance swam within the target area during the first (day 5) and second (day 10) probe trials. (F) Mean distance needed to find all baits in the radial maze during the teaching process. (G) Mean POPS amplitudes evoked by single stimuli via SCs (SC stim) or MFs (MF stim). (H) Stimulation paradigm during LTP induction. (I and J) Relative POPS amplitudes after a 100-Hz HFS of the SCs (SC stim; I) or MFs (MF stim; J). (K and L) E/S curves describing POPS amplitudes in relation to the slope of the extracellular postsynaptic excitatory responses (dEPSP) determined in CA1 neurons before (K) or after (L) tetanization of the SCs. All data are shown as mean \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

network within dendritic spines (Lu et al., 2001; Goldin et al., 2001). On the other hand, prolonged depolarization of excitatory neurons induced by elevated extracellular KCl is known to induce long-term homeostatic changes, e.g., by increasing firing threshold via the distal relocation of the axon initial segment (Grubb and Burrone, 2010; Evans et al., 2013). In our hands, KCl induced a prolonged but reversible depolarization block and, as another morphological indicator of homeostatic plasticity, led to spine expansion within 16 h. Although axon initial segment relocation and spine enlargement are structurally different events, they seem to be regulated by L-type voltage-gated Ca^{2+} channels. The NMDA receptor-dependent activation of PKD, as demonstrated in both cLTP- and KCl-treated cultures, further indicates that elevated intracellular Ca^{2+} levels lead to PKD activation.

Under normal conditions, PKD has a basal activity leading to a slight decrease in actin turnover within the dendritic spines as p-cofilin intensity was reduced, whereas actin incorporation was elevated upon the application of kbNB 142-70. In contrast, endogenous PKD activity is not a key regulator of basal actin turnover in spines, as its inactivation has only mild effects on spine morphology.

LTP induced by high-frequency electrical as well as by chemical stimulation leads to enlargement of spine heads and/or increased ratio of mushroom spines and results in higher synaptic efficacy (Yuste, 2010). Stimulus-evoked structural and functional plasticity of dendritic spines during LTP evolves in a dynamic temporal manner: rapid reorganization of the spine actin cytoskeleton is followed by the stabilization of newly remodeled F-actin and delayed PSD enlargement (Bosch et al., 2014). Depending on the type of stimulus and the detection method, the timescale of these events can differ (Honkura et al., 2008; Rex et al., 2009; Bosch et al., 2014). Regardless of the chemical treatments used, PKD activation was evident during the early phase of spine rearrangements, when the actin pool was in a dynamic state as well as during later phases, paralleled by F-actin stabilization within the spines. Importantly, blocking of endogenous PKD functions efficiently prevented morphological enlargement of spines.

PKD regulates actin stabilization within dendritic spines

Expansion of dendritic spines during LTP requires the formation of a new stable population of actin at the core of the spine head, whereas increased F-actin polymerization continues below the

plasma membrane to generate the force required for spine enlargement (Bosch and Hayashi, 2012). Actin-binding proteins regulating F-actin treadmilling or network superstructure also show regional distribution within dendritic spines (Rácz and Weinberg, 2013). For example, cofilin is located within the dynamic shell region, near the plasma membrane (Rácz and Weinberg, 2006). Intriguingly, immunogold detection of kdPKD-EGFP within hippocampal dendritic spines revealed a very similar localization of the mutant protein within the dynamic shell zone, in the close vicinity of the extrasynaptic plasma membrane. Thus, both regulatory players of the dynamic actin pool are located within the same subsynaptic compartment.

As discussed in the previous section, chemically induced enlargement of dendritic spine heads goes through a transient, dynamic phase, when cofilin is activated and actin incorporation is elevated. Despite elevated PKD activity detected by increased autophosphorylation and by the PKD reporter, PKD inhibition did not detectably affect p-cofilin level in addition to that induced by the chemical stimulations themselves. Therefore, it is likely that PKD activity is counterbalanced by other pathways during this initial, dynamic phase that strongly shifts the cofilin cycle toward activation. Activation of NMDA receptors, for example, regulates the protein phosphatase 2B or calcineurin (Quinlan and Halpain, 1996), known to counterbalance phosphorylation of SSH1 (Wang et al., 2005). Additionally, PKD inhibition may affect other substrates known to regulate actin remodeling, e.g., cortactin (Eiseler et al., 2010), too. Cortactin is concentrated in dendritic spines of cultured hippocampal neurons and has been implicated in the activity-dependent regulation of spine morphogenesis as well (Hering and Sheng, 2003).

Inactivation of cofilin by Ser3 phosphorylation occurs during LTP and leads to an increase in F-actin levels as well as to the appearance of enlarged spine heads (Fukazawa et al., 2003; Chen et al., 2007). During the consolidating phase of spine rearrangements, PKD activity was required for morphological rearrangements as well as for cofilin inactivation and actin stabilization. Although a kbNB 142-70-mediated decrease in PAK4 and SSH1 phosphorylation was detectable in the cultures only up to 8 h of depolarization, this could be the result of the insensitivity of Western blot to detect subcellular and tissue-specific phosphorylation events at later time points. Nevertheless, our data provide convincing evidence that PKD-mediated regulation of F-actin stabilization is needed especially during the consolidating, late phase of plasticity-induced spine enlargement.

PKD regulates synaptic plasticity and memory formation

According to pre-HFS data, kdPKD-EGFP expression did not influence basal synaptic activity, which is concordant with the similar performance during the initial training days in spatial learning tests. Thus, compensatory mechanisms within the neuronal circuitry act in a homeostatic way to preserve baseline synaptic activity even when endogenous PKD activity is impaired (Mateos et al., 2007; Segal, 2010). In contrast, HFS revealed important differences between control and kdPKD-EGFP-expressing mice. Although E/S potentiation (Wheal et al., 1998) was evident in control recordings, it was inhibited upon kdPKD-EGFP expression. As the increase in POPS amplitudes upon HFS was reduced in kdPKD-EGFP recordings, we conclude that postsynaptic inhibition of endogenous PKD functions is responsible for decreased LTP. This is in accordance

with the localization of the mutant PKD protein within the dendritic spines and dendrites of CA1 neurons.

So far, PKD has been indicated in a special form of associative learning observed in *Caenorhabditis elegans*: DKF-2B, a neuron-specific PKD isoform of the worm, is essential for the starvation-induced avoidance of previously attractant salt taste (Fu et al., 2009) and, recently, in cocaine-induced locomotor hyperactivity (Wang et al., 2014). In our experiments, ablation of endogenous PKD activity within the hippocampus specifically inhibited spatial learning without affecting motor coordination, overall anxiety, or object recognition performance, which are regulated by hippocampus-independent circuits (Antunes and Biala, 2012). In the Morris water maze and the radial maze, which are widely used to test hippocampus-dependent spatial memory formation (Sharma et al., 2010), kdPKD-EGFP animals showed no improvement. Although reentry into the originally baited arms (representing working memory error) was similar in comparison with controls, kdPKD-EGFP animals frequently entered into never-baited arms, which is an additional sign of impaired spatial reference memory (Sharma et al., 2010). Importantly, cofilin-dependent actin dynamics are specifically required for associative learning, whereas short-term working memory and exploratory learning are cofilin independent (Rust et al., 2010).

Morphological changes as well as plasticity within dendritic spines are dependent on several molecular factors. In neurons, PKD so far regulates intracellular transport, surface localization, and phosphorylation of transmembrane receptors (Cabrera-Poch et al., 2004; Bisbal et al., 2008; Wang et al., 2014; Quassollo et al., 2015), development and maintenance of dendritic arborization (Horton et al., 2005; Czöndör et al., 2009), production of growth factors (Xu et al., 2013), and neurotrophin signaling (Arévalo et al., 2006). Besides all of these possible effects, our work provides evidence that during activity-induced potentiation and enlargement of spines, PKD is a major regulator of F-actin stabilization, directly influencing learning and memory formation.

Materials and methods

Animal handling

CD1, CaMKII α -rtTA2 (Michalon et al., 2005), or kdPKD1-EGFP (Czöndör et al., 2009) transgenic mice were housed in the animal facility at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, with 12-h light/dark cycles and ad libitum access to food and water. All experiments complied with local guidelines and regulations for the use of experimental animals (PEI/001/1108-4/2013 and PEI/001/1109-4/2013 for the experiments performed in Budapest), in agreement with the European Union and Hungarian legislation, or were approved by the Regierungspräsidium Stuttgart. DOX was administered in wet food at 6-mg/g dose for up to 16 wk with ad libitum access.

Cell cultures, transfection, and chemical treatment

Primary cultures of embryonic hippocampal cells were prepared from CD1 mice on embryonic day 17–18 according to Czöndör et al. (2009). Cells were seeded onto poly-L-lysine–laminin (Sigma-Aldrich)-coated glass coverslips in 24-well plates at 1.5×10^5 cells/well or onto poly-L-lysine-coated 6-well plates at 7×10^5 or 96-well plates at 3×10^4 cells/well density. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with the following constructs: PKDreporter-pEGFP-C1-L-pS294-L, PKDreporter-pEGFP-C1-L-pS294A-L (Czöndör et al., 2009), pEGFP-N1 (Takara Bio Inc.), and pEGFP-N1-PKC μ ^{K612W} (Hausser et al., 2002). Cultures were treated with 1 μM phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu; Sigma-Aldrich), 1 μM nifedipine (Sigma-Aldrich), and 3 μM kbNB 142-70,

10 μ M MK-801, 50 μ M APV, or 1 μ M ω -conotoxin MVIIIC (all from Tocris Bioscience) for the indicated time. Depolarization was induced by adding 20 mM KCl to the culture medium, reaching 25 mM KCl in total. In control cultures, 20 mM NaCl was applied.

cLTP was performed at 37°C. Cells were incubated in ECS buffer (150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 10 mM Hepes, 30 mM glucose, 0.5 μ M tetrodotoxin, 20 μ M bicuculline, and 1 μ M strychnine, pH 7.4) for 5 min. 200 μ M glycine was applied for 3 min in ECS buffer, and then medium was changed back to the original medium, in which cells survived for an additional 5, 30, or 120 min. Inhibitors (APV or kbNB 142-70) were present in the buffers throughout the experiment. Antagonists were all from Tocris Bioscience.

Whole cell patch clamp recordings

Electrophysiological recordings of hippocampal neurons were performed under an A1 AxioObserver microscope (Carl Zeiss). Spontaneous activity and evoked responses were recorded at room temperature (21–23°C) under whole cell conditions. Signals were amplified using a MultiClamp700B (Molecular Devices) and acquired at 20 kHz using the data acquisition software DASYLab version 11 (National Instruments). Patch pipettes were pulled from standard wall glass of 1.5 mm OD (Warner Instruments) and had input resistances of 7–10 M Ω . The composition of the bath solution (aCSF) was (mM) 125 NaCl, 3.5 KCl, 2 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 1.25 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , and 10 glucose, pH 7.4. For depolarizing treatment, an additional 20 mM KCl or NaCl was added. For recording action potentials and voltage-gated currents, patch electrodes were filled with the following solution (mM): 100 K-Gluconate, 10 KCl, 10 KOH, 10 Hepes, and 0.2 EGTA, pH 7.3. To record voltage responses of the neurons, stepwise current commands of 350-ms duration were used, starting at -200 pA and incremented by 5 pA. Analysis of the evoked responses was performed by software developed by A. Szűcs (IVAnalyzer). Multiple physiological parameters, including the resting membrane potential, rheobase, input resistance at rest, spike amplitude, and half-width, among others, were determined for each cell.

Immunostaining and microscopy in fixed cultures

Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde and immunostained essentially as described by Czöndör et al. (2009). Primary antibodies were a-pS294 (anti-PI4KIIIB-pS294, mouse, 1:1,000; Sigma-Aldrich), a-p-cofilin (pSer3, rabbit, 1:1,000; Cell Signaling Technology), and anti-PSD95 (mouse, 1:500; Thermo Fisher Scientific). Appropriate Alexa Fluor-labeled secondary antibodies (Invitrogen) were applied in 1:500 dilution. Images were taken with an LSM 710 (Carl Zeiss) or with a FluoView 500 LSM IX81 (Olympus) microscope with Plan Aplanachromat 63 \times /1.4 or Plan Aplanachromat 60 \times /1.1 immersion objectives, respectively, using 0.8–airy unit aperture. a-pS294/EGFP ratio images within dendritic spines were calculated using the Ratio Plus plugin of ImageJ (National Institutes of Health) by summarizing the intensity of three adjacent Z-stacks within the manually drawn regions of interest (ROIs), followed by subtracting background fluorescent intensity. a-pS294/EGFP ratio along the dendritic spines was determined along a 10-pixel-wide line drawn from the head to the shaft regions. For p-cofilin staining, single PSD95-positive spine heads were delineated manually in the appropriate Z-stack, and mean p-cofilin intensity was determined within these ROIs by ImageJ and normalized to the PSD area. In all parallel experiments, images were recorded with the same microscopic settings with 0.7–airy unit aperture. All experiments were repeated at least three times using independent cultures. Measurements and morphological characterization of dendritic protrusions were performed manually, using ImageJ according to the following criteria: stubby and filamentous spines possessed an HN index below 1.2, while

they were either shorter or longer than 0.8 μ m, respectively; mushroom spines had an HN index above 1.2, with a length exceeding 0.8 μ m.

Actin barbed end assay

Actin barbed end assay was performed in barbed end buffer (138 mM KCl, 20 mM Hepes, 3 mM EGTA, 4 mM MgCl_2 , and 1% BSA, pH 7.5) at 37°C. After a brief wash, cultures were treated with 0.45 μ M rhodamine-conjugated nonmuscle G-actin (Cytoskeleton) for 2 min in barbed end buffer containing 0.2 mg/ml saponin, 1 mM ATP, and 0.5 mM DTT at 37°C. Cultures were fixed in 4% PFA in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , and 0.12 M sucrose, pH 7.0) and stained for PSD95 (see previous section). Images were taken with a FluoView 500 IX81 microscope using a Plan Aplanachromat 60 \times /1.1 immersion objective with identical microscopic settings with 0.8–airy unit aperture. Mean rhodamine-actin intensity values were determined within ROIs manually drawn over PSD95-positive dendritic spines and normalized to the PSD area.

Western blot

Whole cell extracts from hippocampal neuronal cultures were obtained by harvesting in lysis buffer as described in Czöndör et al. (2009). Equal protein amounts of the corresponding samples were subjected to SDS-PAGE (NuPAGE Novex Bis-Tris Gel; 4–12%; Invitrogen) and blotted onto nitrocellulose membrane (Life Sciences). After blocking with 0.5% blocking reagent (Roche) in PBS–0.05% Tween, membranes were probed with specific antibodies as follows: anti-phospho-PKD (a-pS910 rabbit, 1:2,000; Haussler et al., 2002), anti-PKD1 (C20 rabbit, 1:2,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-p-cofilin (pSer3 rabbit, 1:1,000; Cell Signaling Technology), anti-cofilin (rabbit, 1:1,000; Cell Signaling Technology), anti-phospho-Slingshot-1L (pSer978 rabbit, 1:1,000; ECM Biosciences), anti-Slingshot-1L (rabbit, 1:1,000; Abcam), anti-phospho-PAK4/5/6 (pSer474/602/560 rabbit, 1:2,000; Cell Signaling Technology), anti-PAK4 (rabbit, 1:1,000; Cell Signaling Technology), and anti-GAPDH (rabbit, 1:6,000; Sigma-Aldrich).

Signals were visualized with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (1:10,000; Dianova) using ECL or the SuperSignal West Dura Luminol enhancer substrate. Membranes were stripped in 62.5 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, and 14.3 mM β -mercaptoethanol for 30 min at 50°C and then reprobed with the indicated antibodies. Mean intensity values were calculated from 2–13 independent cultures using ImageQuant TL software (GE Healthcare) as phospho-specific/total protein/GAPDH ratios. Relative inhibition of phosphorylation by kbNB 142-70 was determined by comparing mean intensity values between kbNB-treated and nontreated samples from the same time point. Normalized values from 3–14 independent cultures were averaged.

Cell viability and neuronal survival assays

Viability of the cultures treated with an excess of 20 mM KCl or NaCl was measured by the MTT assay. Cells grown in 96-well plates were treated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) in a final concentration of 250 μ g/ml for 40 min and then dissolved in acidic (0.08 M HCl) isopropanol (Merck). OD was determined at 570 nm with an ELISA reader (Bio-Rad Laboratories). Mean viability values were normalized to data obtained from nontreated cells. Neuronal survival was determined by calculating the percentage of neurons with distorted phase-contrast picture and pyknotic nuclei revealed by DAPI staining. At least 30 fields of view were analyzed from three independent cultures.

EM

Experiments were performed in 5–6-mo-old control and kdP-KD-EGFP-expressing animals, which were fed for 10–12 wk with

DOX. Aldehyde-fixed brain sections from perfused animals were processed by standard immunoperoxidase EM protocol (for details see Racz and Weinberg (2006)) using a polyclonal rabbit anti-GFP antibody (1:1,000; Invitrogen). Plastic-embedded ultrathin sections were examined in a T1011 electron microscope (JEOL) at 80 KV; images were collected with a MegaView (Soft Imaging System) 12-bit 1024 × 1024 charge-coupled device camera.

Electron micrographs of randomly selected fields containing immunolabeled pyramidal neurons were taken from the middle 1/3 region of CA1 stratum radiatum or CA3 stratum lucidum. Spine profiles were selected for quantitative analysis only when they contained a clear PSD and were opposed to presynaptic boutons containing synaptic vesicles. Synaptic profile areas, perimeters, and profile circularity ($4\pi \times \text{area}/\text{perimeter}^2$) were measured by ImageJ.

Behavioral tests

16 control (single transgene) and 16 double transgenic male littermates were used from *kdPKD-EGFP^{+/+} × CamKII α rtTA2^{+/−}* breedings. DOX treatment was started from the 7th to 10th weeks of age and lasted for 16 wk altogether. Novel object recognition was performed before the onset and during the 12th week of treatment. Mice were habituated to the arena for 5 min. The next day, animals explored two identical objects for 5 min (A1 and A2) and then 5 h later one familiar (A1) and a novel (B) object again for 5 min. Object exploration time was defined as the time spent sniffing at the objects. The DI was calculated as $(B \text{ exploration time} - A1 \text{ exploration time}) / (B \text{ exploration time} + A1 \text{ exploration time})$. The open field test was executed in the fifth week of DOX treatment. Mice were placed in the middle of a 48 × 48 × 40-cm open arena (Experimetria Ltd.) and were allowed to move freely for 5 min. Their behavior and trajectories were monitored and analyzed by the Conducta Advanced System 1.0. Morris water maze tests were performed during the 9th and 10th weeks of DOX. A round, 105-cm diameter tank was filled with 25 cm of water ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). On day 0, a visible platform was placed into the pool with visual cues on the walls. Mice were allowed to swim for a maximum 60 s. If they failed to reach the platform, they were placed on it for 20 s. From day 1, the escape platform (8-cm diameter) was submerged 1 cm below the surface of the water. Mice were trained for 10 consecutive days, with four trials per day. On the 5th and 10th day, the platform was removed, and the time and distance spent searching around a 24-cm diameter area over the original platform was calculated. The radial arm maze test was performed during the 15th to 16th week of DOX treatment, essentially as described by Gellért et al. (2012). Mice were habituated to the radial maze for four consecutive days, and then four baits were positioned into every second arm. During the task, mice were positioned at the center, and the time and trajectories needed for finding all baits were recorded.

Electrophysiological recording of hippocampal synaptic transmission

Experiments were performed essentially as described in Borbély et al. (2009). In short, mice were decapitated under ether anesthesia, and 400- μm -thick horizontal hippocampal slices were cut. Slices were stored at room temperature for 1 h in carbogenated (95% O₂ and 5% CO₂) standard artificial cerebrospinal fluid and then transferred into a Haas-type recording chamber with continuous artificial cerebrospinal fluid perfusion and carbogene saturation at $33 \pm 1^\circ\text{C}$.

Glass microelectrodes filled with 1 M NaCl were positioned as recording electrodes in the stratum pyramidale of the hippocampal CA1 region, whereas bipolar tungsten-stimulating electrodes were positioned either at the MF tract to evoke disynaptic POPSs or at the SCs to evoke monosynaptic responses. Amplified and conditioned signal was digitized for subsequent off-line analysis.

The viability of slices was tested before each experiment. If POPS amplitude at maximum stimulus intensity was smaller than 3 mV, the slice was excluded from the experiments. Slices were tetanized with the intensity that elicited 70% of maximal POPS amplitude. At the beginning of the data recording session, 0.1-Hz continuous stimulation was applied for 10 min (test stimulation), and then HFS trains (2 × 6-s 100-Hz stimulus train, 10-s interval) were applied for LTP induction. Subsequently, 0.1-Hz continuous test stimulation was used to detect the changes in excitability during 30 min. Averaged responses evoked at medium stimulation intensity were calculated as a mean of amplitude of six POPSs before and during the 30 min after LTP induction.

Statistical analyzes of the data

For statistical evaluation, Student's *t* test, Tukey's post-hoc, or nonparametric Mann–Whitney tests were used. Excel (Microsoft), Kaleidagraph (Synergy Software), or SPSS Statistics (IBM) was used to compute statistics. Data are displayed as mean \pm SEM, unless otherwise indicated.

Online supplemental material

Fig. S1 shows depolarization-induced changes in PKD activity reporter phosphorylation, neuronal viability, and electrophysiological properties. Fig. S2 shows concentration-dependent effects of PKD inhibitors on the phosphorylation of PKD activity reporter and their toxicity and the relative inhibition of PKD-mediated phosphorylation of downstream targets by kbNB 142-70. Fig. S3 provides additional behavioral data from the open field, Morris water maze, and radial maze tests. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201501114/DC1>.

Acknowledgements

We are grateful to Krisztina Móritz, Judit Laszy, Marianna Ruzsika, and Dániel Varga for their help in establishing the appropriate behavioral experiments and Tünde Magyar and Renáta Pop for the technical assistance of EM preparations.

Research was supported by Hungarian Scientific Research Foundation grants K81934 to K. Schlett and K83830 to B. Rácz, by the KTIA_NAP_13-2014-0018 to K. Schlett, by the 39957 MÖB-DAAD travel exchange program to K. Schlett and A. Hausser, by the PF247/13-1 DFG project to K. Pfizenmaier and K. Schlett, and by the Gedeon Richter Centenarium Foundation to N. Bencsik and K. Schlett. B. Rácz is supported by the Research Faculty Grant 2014 of the Faculty of Veterinary Science, Szent István University, and by the János Bolyai Research Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 28 January 2015

Accepted: 23 July 2015

References

- Antunes, M., and G. Biala. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* 13:93–110. <http://dx.doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Arévalo, J.C., D.B. Pereira, H. Yano, K.K. Teng, and M.V. Chao. 2006. Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281:1001–1007. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M504163200>
- Bisbal, M., C. Conde, M. Donoso, F. Bollati, J. Sesma, S. Quiroga, A. Díaz Añel, V. Malhotra, M.P. Marzolo, and A. Cáceres. 2008. Protein kinase D regulates trafficking of dendritic membrane proteins in devel-

- oping neurons. *J. Neurosci.* 28:9297–9308. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1879-08.2008>
- Borbély, S., E. Dobó, D. Czégé, E. Molnár, M. Bakos, B. Szucs, A. Vincze, I. Világi, and A. Mihály. 2009. Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures. *Neuroscience*. 159:358–368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.027>
- Bosch, M., and Y. Hayashi. 2012. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22:383–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002>
- Bosch, M., J. Castro, T. Saneyoshi, H. Matsuno, M. Sur, and Y. Hayashi. 2014. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*. 82:444–459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
- Bravo-Altamirano, K., K.M. George, M.-C. Frantz, C.R. LaValle, M. Tandon, S. Leimgruber, E.R. Sharlow, J.S. Lazo, Q.J. Wang, and P. Wipf. 2011. Synthesis and structure-activity relationships of benzothienothiazepinone inhibitors of protein kinase D. *ACS Med Chem Lett.* 2:154–159. <http://dx.doi.org/10.1021/ml100230n>
- Cabrera-Poch, N., L. Sánchez-Ruiloba, M. Rodríguez-Martínez, and T. Iglesias. 2004. Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 279:28592–28602. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M312242200>
- Chen, L.Y., C.S. Rex, M.S. Casale, C.M. Gall, and G. Lynch. 2007. Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J. Neurosci.* 27:5363–5372. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0164-07.2007>
- Czöndör, K., K. Ellwanger, Y.F. Fuchs, S. Lutz, M. Gulyás, I.M. Mansuy, A. Hausser, K. Pfizenmaier, and K. Schlett. 2009. Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell.* 20:2108–2120. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E08-09-0957>
- Eiseler, T., A. Hausser, L. De Kimpe, J. Van Lint, and K. Pfizenmaier. 2010. Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cofilin. *J. Biol. Chem.* 285:18672–18683. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.093880>
- Ellwanger, K., and A. Hausser. 2013. Physiological functions of protein kinase D in vivo. *IUBMB Life*. 65:98–107. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1116>
- Evans, M.D., R.P. Sammons, S. Lebron, A.S. Dumitrescu, T.B. Watkins, V.N. Uebele, J.J. Renger, and M.S. Grubb. 2013. Calcineurin signaling mediates activity-dependent relocation of the axon initial segment. *J. Neurosci.* 33:6950–6963. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0277-13.2013>
- Frost, N.A., J.M. Kerr, H.E. Lu, and T.A. Blanpied. 2010. A network of networks: cytoskeletal control of compartmentalized function within dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20:578–587. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.009>
- Fu, Y., M. Ren, H. Feng, L. Chen, Z.F. Altun, and C.S. Rubin. 2009. Neuronal and intestinal protein kinase d isoforms mediate Na⁺ (salt taste)-induced learning. *Sci. Signal.* 2:ra42. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2000224>
- Fuchs, Y.F., S.A. Eisler, G. Link, O. Schlicker, G. Bunt, K. Pfizenmaier, and A. Hausser. 2009. A Golgi PKD activity reporter reveals a crucial role of PKD in nocodazole-induced Golgi dispersal. *Traffic*. 10:858–867. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00918.x>
- Fukazawa, Y., Y. Saitoh, F. Ozawa, Y. Ohta, K. Mizuno, and K. Inokuchi. 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*. 38:447–460. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00206-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00206-X)
- Gellért, L., D. Varga, M. Ruszka, J. Toldi, T. Farkas, I. Szatmári, F. Fülöp, L. Vécsei, and Z. Kis. 2012. Behavioural studies with a newly developed neuroprotective KYNA-amide. *J. Neural Transm.* 119:165–172. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-011-0692-8>
- Goldin, M., M. Segal, and E. Avignone. 2001. Functional plasticity triggers formation and pruning of dendritic spines in cultured hippocampal networks. *J. Neurosci.* 21:186–193.
- Grubb, M.S., and J. Burrone. 2010. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*. 465:1070–1074. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09160>
- Hausser, A., G. Link, L. Bamberg, A. Burzlaff, S. Lutz, K. Pfizenmaier, and F.-J. Johannes. 2002. Structural requirements for localization and activation of protein kinase C μ (PKC μ) at the Golgi compartment. *J. Cell Biol.* 156:65–74. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200110047>
- Hazai, D., R. Szudoczki, J. Ding, S.H. Soderling, R.J. Weinberg, P. Sötonyi, and B. Rácz. 2013. Ultrastructural abnormalities in CA1 hippocampus caused by deletion of the actin regulator WAVE-1. *PLoS ONE*. 8:e75248. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075248>
- Hering, H., and M. Sheng. 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cofilin in dendritic spine morphogenesis. *J. Neurosci.* 23:11759–11769.
- Holtmaat, A., and K. Svoboda. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10:647–658. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2699>
- Honkura, N., M. Matsuzaki, J. Noguchi, G.C.R. Ellis-Davies, and H. Kasai. 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*. 57:719–729. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.013>
- Horton, A.C., B. Rácz, E.E. Monson, A.L. Lin, R.J. Weinberg, and M.D. Ehlers. 2005. Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron*. 48:757–771. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.11.005>
- LaValle, C.R., K. Bravo-Altamirano, K.V. Giridhar, J. Chen, E. Sharlow, J.S. Lazo, P. Wipf, and Q.J. Wang. 2010a. Novel protein kinase D inhibitors cause potent arrest in prostate cancer cell growth and motility. *BMC Chem. Biol.* 10:5. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6769-10-5>
- LaValle, C.R., K.M. George, E.R. Sharlow, J.S. Lazo, P. Wipf, and Q.J. Wang. 2010b. Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1806:183–192.
- Lu, W., H. Man, W. Ju, W.S. Trimble, J.F. MacDonald, and Y.T. Wang. 2001. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. 29:243–254. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00194-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00194-5)
- Mateos, J.M., A. Lüthi, N. Savic, B. Stierli, P. Streit, B.H. Gähwiler, and R.A. McKinney. 2007. Synaptic modifications at the CA3-CA1 synapse after chronic AMPA receptor blockade in rat hippocampal slices. *J. Physiol.* 581:129–138. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120550>
- Michalon, A., K. Koshibu, K. Baumgärtel, D.H. Spirig, and I.M. Mansuy. 2005. Inducible and neuron-specific gene expression in the adult mouse brain with the rtTA2S-M2 system. *Genesis*. 43:205–212. <http://dx.doi.org/10.1002/gene.20175>
- Mizuno, K. 2013. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* 25:457–469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.001>
- Ni, Y., J. Sinnett-Smith, S.H. Young, and E. Rozengurt. 2013. PKD1 mediates negative feedback of PI3K/Akt activation in response to G protein-coupled receptors. *PLoS ONE*. 8:e73149. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073149>
- Okamoto, K., T. Nagai, A. Miyawaki, and Y. Hayashi. 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7:1104–1112. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1311>
- Olayioye, M.A., S. Barisic, and A. Hausser. 2013. Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D. *Cell. Signal.* 25:1739–1747. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.010>
- Oster, H., D. Abraham, and M. Leitges. 2006. Expression of the protein kinase D (PKD) family during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns*. 6:400–408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.modgep.2005.09.006>
- Penzes, P., and M.E. Cahill. 2012. Deconstructing signal transduction pathways that regulate the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 69:426–441. <http://dx.doi.org/10.1002/cm.21015>
- Pontello, C.G., and I.M. Ethell. 2009. Accelerators, brakes, and gears of actin dynamics in dendritic spines. *Open Neurosci J.* 3:67–86. <http://dx.doi.org/10.2174/187408200903020067>
- Quassollo, G., J. Wojnacki, D.A. Salas, L. Gastaldi, M.P. Marzolo, C. Conde, M. Bisbal, A. Couve, and A. Cáceres. 2015. A RhoA signaling pathway regulates dendritic Golgi outpost formation. *Curr. Biol.* 25:971–982. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.075>
- Quinlan, E.M., and S. Halpain. 1996. Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors. *Neuron*. 16:357–368. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80053-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80053-7)
- Racz, B., and R.J. Weinberg. 2006. Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience*. 138:447–456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.025>
- Rácz, B., and R.J. Weinberg. 2013. Microdomains in forebrain spines: an ultrastructural perspective. *Mol. Neurobiol.* 47:77–89. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-012-8345-y>
- Rémillard-Labrosse, G., C. Mihai, J. Duron, G. Guay, and R. Lippé. 2009. Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane. *Traffic*. 10:1074–1083. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00939.x>
- Rex, C.S., L.Y. Chen, A. Sharma, J. Liu, A.H. Babayan, C.M. Gall, and G. Lynch. 2009. Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *J. Cell Biol.* 186:85–97. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200901084>

- Rust, M.B., C.B. Gurniak, M. Renner, H. Vara, L. Morando, A. Görlich, M. Sassoè-Pognetto, M.A. Banchaabouchi, M. Giustetto, A. Triller, et al. 2010. Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J.* 29:1889–1902. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.72>
- Segal, M. 2010. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur. J. Neurosci.* 31:2178–2184. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07270.x>
- Sharma, S., S. Rakoczy, and H. Brown-Borg. 2010. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 87:521–536. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.09.004>
- Star, E.N., D.J. Kwiatkowski, and V.N. Murthy. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat. Neurosci.* 5:239–246. <http://dx.doi.org/10.1038/nn811>
- Steinberg, S.F. 2012. Regulation of protein kinase D1 activity. *Mol. Pharmacol.* 81:284–291. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.111.075986>
- Wang, Y., F. Shibasaki, and K. Mizuno. 2005. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J. Biol. Chem.* 280:12683–12689. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411494200>
- Wang, N., P. Su, Y. Zhang, J. Lu, B. Xing, K. Kang, W. Li, and Y. Wang. 2014. Protein kinase D1-dependent phosphorylation of dopamine D1 receptor regulates cocaine-induced behavioral responses. *Neuropsychopharmacology.* 39:1290–1301. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.341>
- Wheal, H.V., C. Bernard, J.E. Chad, and R.C. Cannon. 1998. Pro-epileptic changes in synaptic function can be accompanied by pro-epileptic changes in neuronal excitability. *Trends Neurosci.* 21:167–174. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01182-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01182-X)
- Xu, P., K.M. Rosen, K. Hedstrom, O. Rey, S. Guha, C. Hart, and G. Corfas. 2013. Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia.* 61:1029–1040. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22491>
- Yuste, R. 2010. Dendritic spines. MIT Press, Cambridge. 264 pp. <http://dx.doi.org/10.7551/mitpress/9780262013505.001.0001>

A New Tool for the Quantitative Analysis of Dendritic Filopodial Motility

Krisztián Tárnok,¹ Márton Gulyás,¹ Norbert Bencsik,¹ Katalin Ferenc,¹ Klaus Pfizenmaier,² Angelika Hausser,² Katalin Schlett^{1*}

¹Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Loránd University, Pázmány P. stny. 1/C, H-1117 Budapest, Hungary

²Institute of Cell Biology and Immunology, University of Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany.

Received 27 May 2014; Revised 5 August 2014; Accepted 1 September 2014

Grant sponsor: Hungarian Scientific Research Foundation, Grant numbers: K81934 and KTIA NAP B; Grant sponsors: 39957 MÖB-DAAD travel exchange program, PF247/13-1 DFG project, Grant number: ASTF 221-2011.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Katalin Schlett; Eötvös Loránd University, Department of Physiology and Neurobiology, Pázmány P. stny 1/C, Budapest, H-1117. E-mail: schlett@ludens.elte.hu

Krisztián Tárnok and Márton Gulyás contributed equally to this work.

Published online 25 September 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22569

© 2014 International Society for Advancement of Cytometry

• Abstract

Dendritic filopodia are tiny and highly motile protrusions formed along the dendrites of neurons. During the search for future presynaptic partners, their shape and size change dynamically, with a direct impact on the formation, stabilization and maintenance of synaptic connections both in vivo and in vitro. In order to reveal molecular players regulating synapse formation, quantitative analysis of dendritic filopodia motility is needed. Defining the length or the tips of these protrusions manually, however, is time consuming, limiting the extent of studies as well as their statistical power. Additionally, area detection based on defining a single intensity threshold can lead to significant errors throughout the image series, as these small structures often have low contrast in fluorescent images. To overcome these problems, the open access Dendritic Filopodia Motility Analyzer, a semi-automated ImageJ/Fiji plugin was created. Our method calculates the displacement of the centre of mass (CoM) within a selected region based on the weighted intensity values of structure forming pixels, selected by upper and lower intensity thresholds. Using synthetic and real biological samples, we prove that the displacement of the weighted CoM reliably characterizes the motility of dendritic protrusions. Additionally, guidelines to define optimal parameters of live cell recordings from dendritic protrusions are provided. © 2014 International Society for Advancement of Cytometry

• Key terms

neuron; dendritic filopodia; motility analysis; time-lapse

MOST excitatory synapses in the mammalian brain terminate on dendritic spines. During neuronal development, transient actin-rich protrusions named dendritic filopodia appear first along the dendrites. Filopodia are highly motile structures, which actively search for future presynaptic contact sites. In the absence of a suitable axonal contact, filopodia retract. On the other hand, initial contact triggers the formation of synaptic machinery and the appearance of dendritic spines (1). Filopodia can change their shape by a nodding motion when the angle between the neck and the head or dendritic shaft is changing. In addition, their length or the width of their head can also alter in time (2–4). Developmental regulation of filopodial motility is required for synapse formation: initial movements and elongations are needed to get into contact with the future presynaptic partner, while motility is attenuated for the successful maintenance of the synaptic connections (5).

In contrast to filopodia, dendritic spines have established synaptic connections, possessing postsynaptic components within the head region of dendritic spines. Stubby spines are shorter, while thin and mushroom spines are usually longer than 1 μm with a well-extended head region in case of mushroom spines. The size and shape of established dendritic spines can also alter during development, in correlation with the stability and the strength of the synapse (1).

To characterize dendritic filopodia and spine motility, some authors manually define the spines' length (4,6–12) or the position of the spine tips (13–15) on two-

dimensional (2D) images. These approaches are tedious and slow, limiting the extent of studies as well as their statistical power. In addition, manual analysis also introduces systematic error, subject to the investigator or hard-to-characterize biases. Attempts to automatically define the most distal pixel of a protrusion is complicated by the fact that the localization of the tip is extremely noise sensitive and that bifurcation or shape alterations are frequent (16). As another approach, motility index can be calculated on binarized images as relative area changes during the recorded intervals (16–20). Although area-based quantification can be carried out relatively easily, fluorescent images from small dendritic protrusions often have low contrast. In this situation, minor changes in the settings of intensity threshold-based binarization can seriously affect the measurement output. An additional problem is due to the phenomenon of segmentation noise: when the intensity value of a certain pixel is very close to the threshold value, categorization of that pixel as foreground or background can change frame by frame due to the slight intensity changes derived from the image noise. This unpredictable noise in delineating foreground pixels results in erroneous outcome.

In order to reduce these effects, we created a semi-automated program named Dendritic Filopodia Motility Analyzer (DFMA). The program calculates the centre of mass (CoM) of dendritic protrusions based on the weighted intensity values of individual pixels limited by upper and lower intensity thresholds within the selected region of interests (ROIs). In this way, instead of defining the exact area of the protrusions, we use the virtual parameter of the weighted CoM to measure the frame-to-frame motility of the investigated structures. Using data obtained from simulated filopodium-like structures or from real biological recordings, we provide evidence that the displacement of the weighted CoM correlates well with the movement of the tip of the measured protrusions and provides reliable data on filopodial motility. Thus, our tailor-made and freely available program provides a user friendly and fast tool to investigate regulatory pathways that impact on filopodial motility.

MATERIALS AND METHODS

Neuronal Cell Cultures and Live Cell Imaging

Primary cultures of embryonic hippocampal cells were prepared from CD1 mice on embryonic day 17–18 essentially as described in Czöndör et al. (21). All procedures were performed under the supervision of Local Animal Care Committee, in agreement with the European Union and Hungarian legislation concerning the care and use of animals (PEI/001/1108-4/2013). Cells were seeded onto poly-L-lysine-laminin (Sigma) coated glass bottom petri dishes (Greiner) at 5×10^5 cells/dish density.

Live cell imaging experiments were carried out in imaging buffer (142 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂, pH 7.4) and at 37°C, with the Zeiss HS CellObserver system equipped with a Plan Apochromat 63×/1.4 oil DIC M27 objective lens and 488 nm blue led illumination by the Colibri system. Hippocampal neurons were transfected with empty

pEGFP vector (Clontech) 20 hours before the experiments using Lipofectamine 2000, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). During the acquisition, dendritic segments were recorded with an AxioCam HR camera with a 2-second frame rate for 20 minutes. In case of fixed cells, cultures were fixed with 4% paraformaldehyde (Taab; w/v in PBS) for 20 min, at 25°C before imaging.

Simulation of Filopodium-Like Structures

Movement of dendritic filopodia was simulated in ImageJ. The skeleton of the filopodium-like structures is based on a quadratic Bézier curve, which is described by two anchor points (P_0 and P_2) and a control point (P_1), defined along the perpendicular bisector of the line segment P_0 – P_2 (see step 1 on Fig. 1A). In our implementation, the curve is drawn in 0.01 step sizes using the following equations:

$$Q_1(d) = (1-d)P_0 + dP_1$$

$$Q_2(d) = (1-d)P_1 + dP_2,$$

$$B(d) = (1-d)Q_1 + dQ_2,$$

where $B(d)$ describes the points of the Bézier curve on a given frame with $d \in [0; e]$ and $e \in [0.5; 1]$. In order to simulate the motility of filopodium-like structures, certain parameters are changed frame by frame to resemble the movement of real filopodia, using the following limitations: (a) The length of the filopodium-like structure depends on e , varying between 0.5 and 1. (b) Frame-to-frame change in e is defined randomly between 0.005 and 0.009. (c) The persistent increase or decrease in e is re-defined randomly, in every 40 frames. (d) Distance between the P_0 and P_2 control points is set at 70 pixels, according to the typical size of filopodia in our recordings. (e) Curvature and the nodding motion is simulated by rotating the P_0 – P_1 – P_2 triangle around the P_0 anchor point by α degree. To prevent the formation of unnatural curvature, α is limited between 45° and 135°. (f) Frame-to-frame change in α is quoted as rotation speed and it varies between 1° and 6°/frame. (g) The y coordinate of the P_1 point is defined randomly with a limitation depending on the actual α value: if $\alpha > 90^\circ$, then $-30 < P_1(y) < 0$ and if $\alpha < 90^\circ$, then $+30 > P_1(y) > 0$.

In order to test the fitting between a manually drawn midline of the filopodium and the theoretical Bézier curve, the end points of the manually drawn midline served as P_0 and P_2 , while P_1 was defined along the perpendicular bisector of the line segment P_0 and P_2 .

To generate realistic images of simulated structures, the skeleton is extended by an 8-pixel width and positioned over a rectangle representing the dendritic shaft (step 2 on Fig. 1A). Gaussian blur ($\sigma = 15$) created by ImageJ is applied to the rectangle, followed by a Gaussian blur ($\sigma = 10$) applied on the combined image (step 3 on Fig. 1A). Additional Gaussian image noise was provided by the “Add noise” function of ImageJ with standard deviation values between 0 and 16, followed by an additional blur ($\sigma = 2$) (step 4 on Fig. 1A).

Calculation of the Weighted CoM

Weighted CoM is calculated by an algorithm where each pixel intensity is transcoded frame-to-frame into a

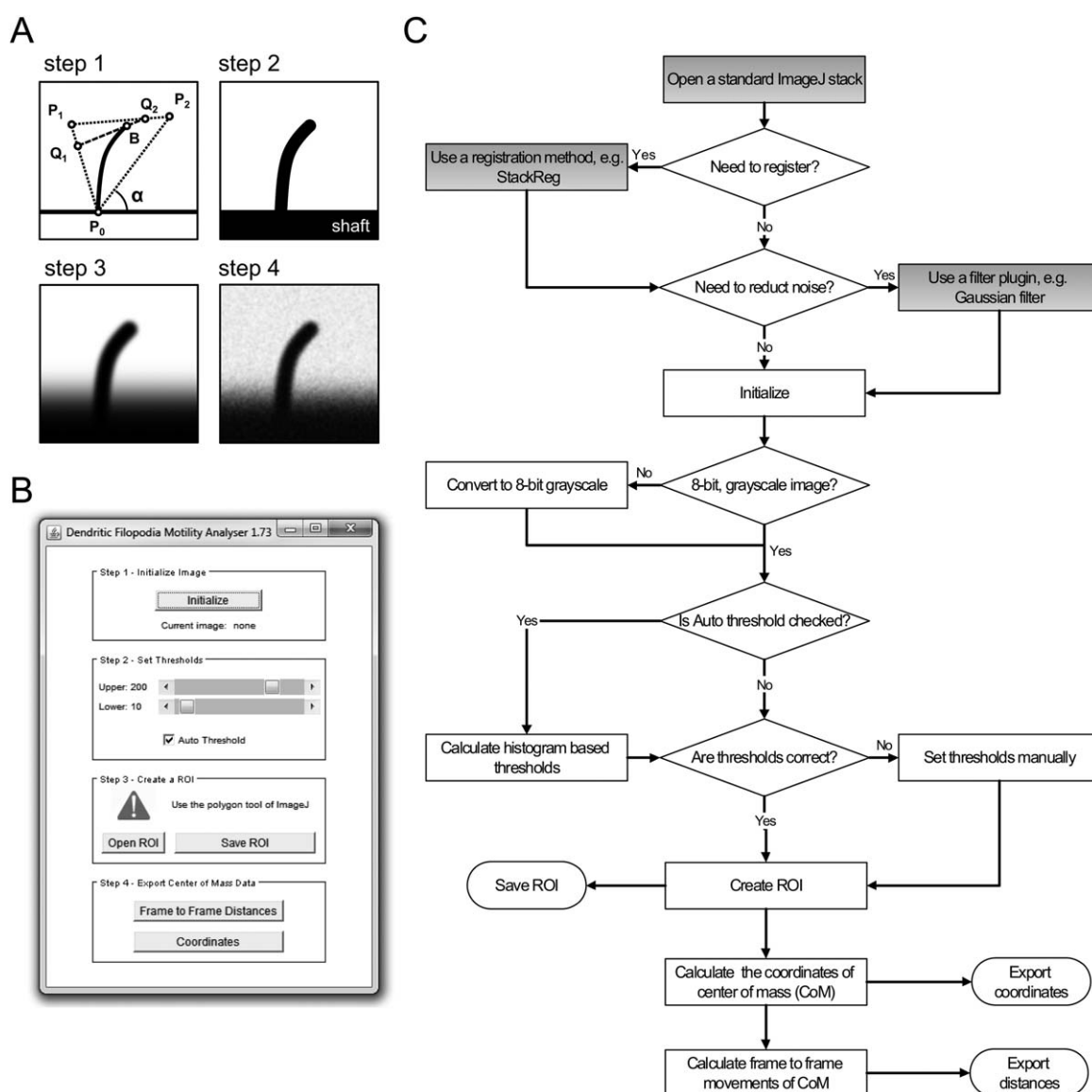


Figure 1. Description of the DFMA plugin. **(A)** Creating a realistic filopodium-like structure based on a quadratic Bézier curve and different filters (see details in “Materials and Methods” section). **(B)** User interface of the plugin. **(C)** Workflow of image analysis. Gray boxes represent the required steps before the initialization of the plugin. See main text for details.

probability describing the involvement of a given pixel in the calculation of the CoM, using the piecewise linear saturation function

$$f(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{if } D(x, y) < A \\ 1 & \text{if } D(x, y) > B \\ \frac{D(x, y) - A}{B - A} & \text{otherwise } B > A \end{cases}$$

where $D(x, y)$ is a function of image pixel intensity, which returns the pixel intensity value corresponding to x - y input; A indicates the lower threshold, where below this limit, pixels are categorized as background pixels (0); B is the upper threshold for foreground pixels (1). Pixel values located

between the two thresholds are weighted from 0 to 1, using linear interpolation. A and B values are set semi-automatically in the DFMA plugin (see below).

When the saturation function $f(x, y)$ is substituted into the calculation of the CoM, then the total mass is:

$$M = \iint f(x, y) dx dy$$

and the coordinates of the centre of the mass are x , y , where

$$x = \frac{1}{M} \iint x f(x, y) dx dy, \quad y = \frac{1}{M} \iint y f(x, y) dx dy$$

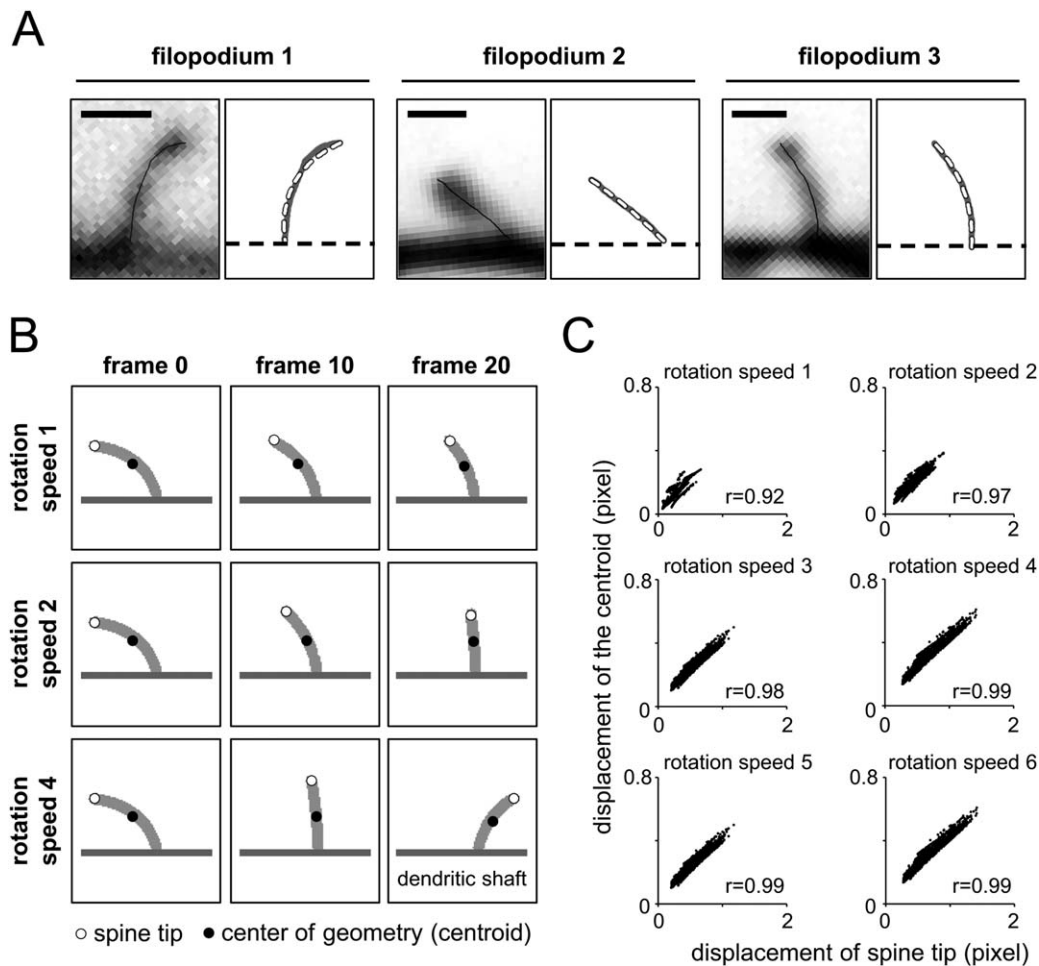


Figure 2. Simulation of dendritic filopodia by quadratic Bézier curves. **(A)** Quadratic Bézier curves fit well to the manually drawn midline of filopodia. Real fluorescent images with the midline (black line) or the midline (gray line) and the calculated Bézier curve (white dashed line) are displayed on the left and right image pairs, respectively. Scale bar is 1 μm . **(B)** Snapshots of simulated filopodium-like structures moving with different speed. End point of filopodium-like structures refers to the simulated spine tip (open circles), while black circles indicate the position of the centroid. **(C)** Correlation between the frame-to-frame displacement of simulated spine tips and the displacement of the centroid in case of different rotation speeds. Pearson correlation coefficient “ r ” is indicated above the x-axis.

Workflow of Image Analysis with the DFMA Plugin

The DFMA plugin is written in Java 1.6. It has been tested with ImageJ 1.48s on Windows and Mac Os X, but it should run on any platform where ImageJ/Fiji and Java are available. The program can be downloaded from the <http://cnblab.elte.hu/DFMA> URL and can be used under GNU GPL3 license.

The user interface of the DFMA is shown on Figure 1B and its workflow is explained in the flowchart Figure 1C. The plugin works with 8-bit, grayscale time-lapse images opened as a standard ImageJ stack. To eliminate the false displacement data of the selected dendritic protrusion due to a potential drift of the original recording, consecutive images of the dendritic segment should be registered using the ready-to-use solutions of Fiji/ImageJ environment, for example, StackReg plugin with the “rigid body” method (22) (see *Plugins/Registration/StackReg* in Fiji).

During the initialization step, the program shows the pixel assigned probabilities (“weights”) displayed by a rainbow lookup table (LUT) and sets the recommended lower and

upper thresholds if the “Auto Threshold” function is activated (referring to A and B values in the saturation function, respectively). The upper threshold is set as the median of the maximal intensity values determined frame by frame from the recording. In case of the lower threshold, a global intensity histogram is generated from all frames of the recording and the highest frequency value is determined. Automatic lower threshold value is set at the intensity value corresponding to the 40% of the maximum frequency value on the lower tail of histogram. The user can set or adjust the optimal upper and lower threshold values manually. Ideally, the minimum weights of the saturation function should be assigned to the suspected outline of the dendritic spine, while the largest values should cover the central regions of the spine. For the sake of convenient threshold setup, image is recolored in real time according to the saturation function.

The coordinates of the CoM are calculated within a user-specified ROI, which should include the whole protrusion and

Table 1. Pearson correlation coefficients between the average movement of the tip and the displacement of the weighted CoM in case of simulated filopodium-like structures, depending on different image noise and speed of movement

IMAGE NOISE		SPEED OF MOVEMENT						ROTATION SPEED (DEGREE/FRAME)
		1	2	3	4	5	6	TIP SPEED (PIXEL/FRAME)
GAUSSIAN NOISE (σ)	BACKGROUND PIXEL VARIANCE	0.20 ± 0.05	0.38 ± 0.10	0.58 ± 0.07	0.83 ± 0.10	0.95 ± 0.22	1.04 ± 0.20	
0	0	0.67	0.82	0.90	0.92	0.95	0.98	
2	0.22 ± 0.02	0.65	0.81	0.90	0.92	0.95	0.97	
4	0.58 ± 0.06	0.61	0.79	0.89	0.91	0.94	0.97	
6	1.17 ± 0.12	0.55	0.76	0.87	0.89	0.93	0.96	
8	2.01 ± 0.21	0.48	0.72	0.85	0.88	0.92	0.95	
10	3.07 ± 0.33	0.42	0.66	0.81	0.86	0.91	0.94	
12	4.35 ± 0.46	0.33	0.62	0.78	0.83	0.89	0.92	
14	5.89 ± 0.62	0.28	0.55	0.74	0.81	0.88	0.91	
16	7.63 ± 0.80	0.20	0.51	0.70	0.78	0.86	0.89	

exclude the dendritic shaft. The defined ROI can be saved and/or reloaded as a .txt file, also containing the threshold values.

The plugin has two main outputs. The program can export the calculated frame-to-frame displacements of the weighted CoM. If the original image series are calibrated, unit of the displacement is according to the calibration. In case of non-calibrated images, the distance is expressed in pixels. Additionally, x–y coordinates of the weighted CoM can be also exported frame by frame, providing versatile base for further analysis, for example, to calculate mean squared displacements.

Manual Image Analysis and Statistics

Positions of spine tips were followed manually on live cell image series of individual dendritic filopodium with the Manual Tracking plugin of Fiji (23). For statistical evaluation, Student's *t*-test and Microsoft Excel was used. Data are displayed as mean \pm SEM.

RESULTS AND DISCUSSION

The Midline of Dendritic Filopodia is Simulated Reliably by Quadratic Bézier Curves

We created filopodium-like structures using quadratic Bézier curves to test our concept that the displacement of the CoM is a usable parameter to follow the movement of elongated, filopodium-like structures (see “Materials and Methods” section and Fig. 1A). In order to prove that the shape of a dendritic filopodium can be described by a Bézier curve, the midline of a filopodium was drawn manually on microscopic images and a quadratic Bézier curve was fitted onto that (see image pairs on Fig. 2A). To check the accuracy of fitting, the squared minimum distances between midline and Bézier curve points were averaged and square root was calculated. This “error value” was normalized to the original length of the manually drawn midline. On average, images from 21 filopodia were fitted with a normalized error value of

0.0093 ± 0.0035 . These data indicate that the length and curvature of filopodia are modeled reliably by our method.

Displacement of the Centre of Geometry Correlates with the Movement of the Tip of Simulated Filopodium-Like Structures

As the displacement of the tip is often used to characterize filopodial movement in biological images (13–15), we investigated whether the movement of the tip and the displacement of the centre of geometry (centroid) are correlated. Filopodial movement was simulated on the Bézier curves by modifying the length, the curvature and the nodding motion of the structures frame by frame, according to the description in “Materials and Methods” section. Different movement speeds were set by changing the frame-to-frame rotation value, leading to different average tip displacements (Table 1; Fig. 2B and Movie 1).

Exact coordinates of the tip and the centroid were determined arithmetically for each frame. As it is shown on Figure 2C, displacement of the simulated tip correlates well with the displacement of the calculated centroid, regardless of the speed of movement.

Correlation Between the Displacement of the Weighted CoM and the Tip of Realistic Filopodium-Like Structures Depends on the Speed of Movement as well as on Background Noise

To create realistic filopodium-like structures, the skeleton defined by the Bézier curve was modified by adding an 8-pixel width and different graphic filters (see Fig. 3A for representative images). In order to relate theoretical Gaussian noise to the background noise of real microscopic images, the mean variance of pixel intensities within the background area was also determined (Table 1).

Weighted CoM of these realistic structures was calculated using our DFMA plugin as described in “Materials and Methods” section. In addition, the exact tip position of simulated structures was calculated using the Bézier curve parameters. We analyzed how the correlation between the movement of

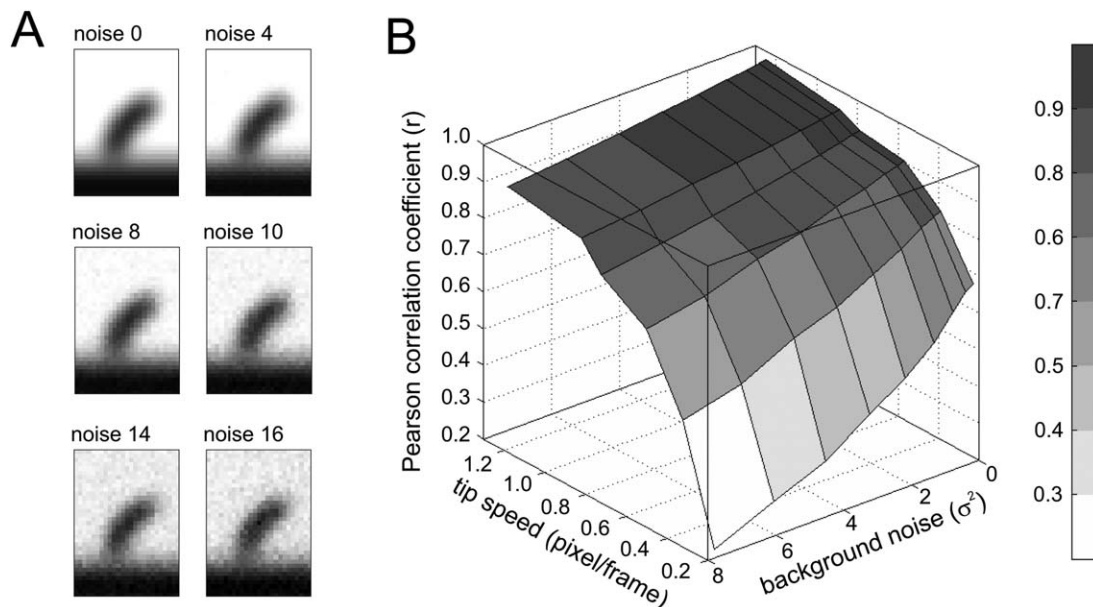


Figure 3. Effects of rotation speed and image noise on the reliability of DFMA plugin. **(A)** Representative images of a simulated filopodium-like structure after the application of different image noise values. **(B)** 3D representation of the correlation between background image noise, tip speed and Pearson correlation coefficient. Calibration bar refers to “*r*” values.

the tip and the displacement of the weighted CoM is affected by background noise and the speed of movement. As it is revealed on Figure 3B and Table 1, increased image noise as well as slow frame-to-frame movement had deteriorative effects on the rate of correlation. These results suggest that the successful application of our plugin on real biological samples depends on the appropriate contrast of the fluorescent images and it is influenced by the speed of the protrusions, as well.

Validation of the DFMA Plugin on Real Dendritic Protrusions

The DFMA plugin has been tested on real biological image series of primary hippocampal dendritic spines and filopodia. Wide-field fluorescent recordings were taken from primary hippocampal neurons expressing EGFP. Cultured neurons have an extended dendritic arbor (Fig. 4A) with long and thin filopodia as well as stubby and mushroom spines formed on the secondary and tertiary dendrites (Fig. 4B).

To validate the correlation between tip movement and the displacement of the weighted CoM defined on the simulated structures (see Figs. 2 and 3), we manually marked the tips of 20 filopodia during 300 frames of recordings and run the DFMA plugin on the same structures. The trajectories of the tips and the CoMs similarly resembled non-directed movements, where the tip obviously searches over a larger area than the corresponding weighted CoM (Fig. 4C and Movie 5). As it is shown on Figure 4D, displacement of the weighted CoM correlates with the average displacement of the manually defined spine tips ($r = 0.83$). In agreement, average variance of background intensity values was 2.07 ± 1.51 , while average tip speed was 0.84 ± 0.28 pixel/frame, defining a similar Pearson correlation value in case of simulated structures (Table 1).

Motility Differences Between Fixated and Living Protrusions are Verified by the DFMA Plugin

To quantitatively analyze motility differences between different types of protrusions, the weighted CoM of mushroom spines and filopodia were determined. Image series from cultures fixed with paraformaldehyde served as non-moving controls (see Movies 2, 3, and 4 for representative image series of a filopodium, a mushroom spine or a fixed protrusion, respectively). According to the time-averaged mean displacement of the weighted CoM (Fig. 4E), a small average displacement of fixed filopodia was detected, albeit these values showed no correlation with the time-window of analysis. Thus, the movement of the fixed protrusions is biologically irrelevant and is probably due to the unbiased noise inevitably present during recordings.

Filopodia and mushroom spines showed significantly different motility from the average displacement of fixed spines only in case the time-window of analysis exceeded $\Delta t > 4$ seconds or $\Delta t > 8$ seconds, respectively. This is due to the fact that the rate of movement by living filopodia or spines within short time periods was comparable to the unbiased noise observed in the fixed cultures. These observations additionally emphasize that a minimal frame-to-frame displacement is required during the reliable analysis of biological samples. Regardless of the time window of analysis, filopodia were always faster than mushroom spines. This fits to our expectations and to published data, describing filopodia as highly motile and transient structures (4,16,24,25).

Interestingly, data points indicated a radical relation between the time window (Δt) and the average displacement of the weighted CoM. While directed movement is described by a linear relation between the net displacement of the

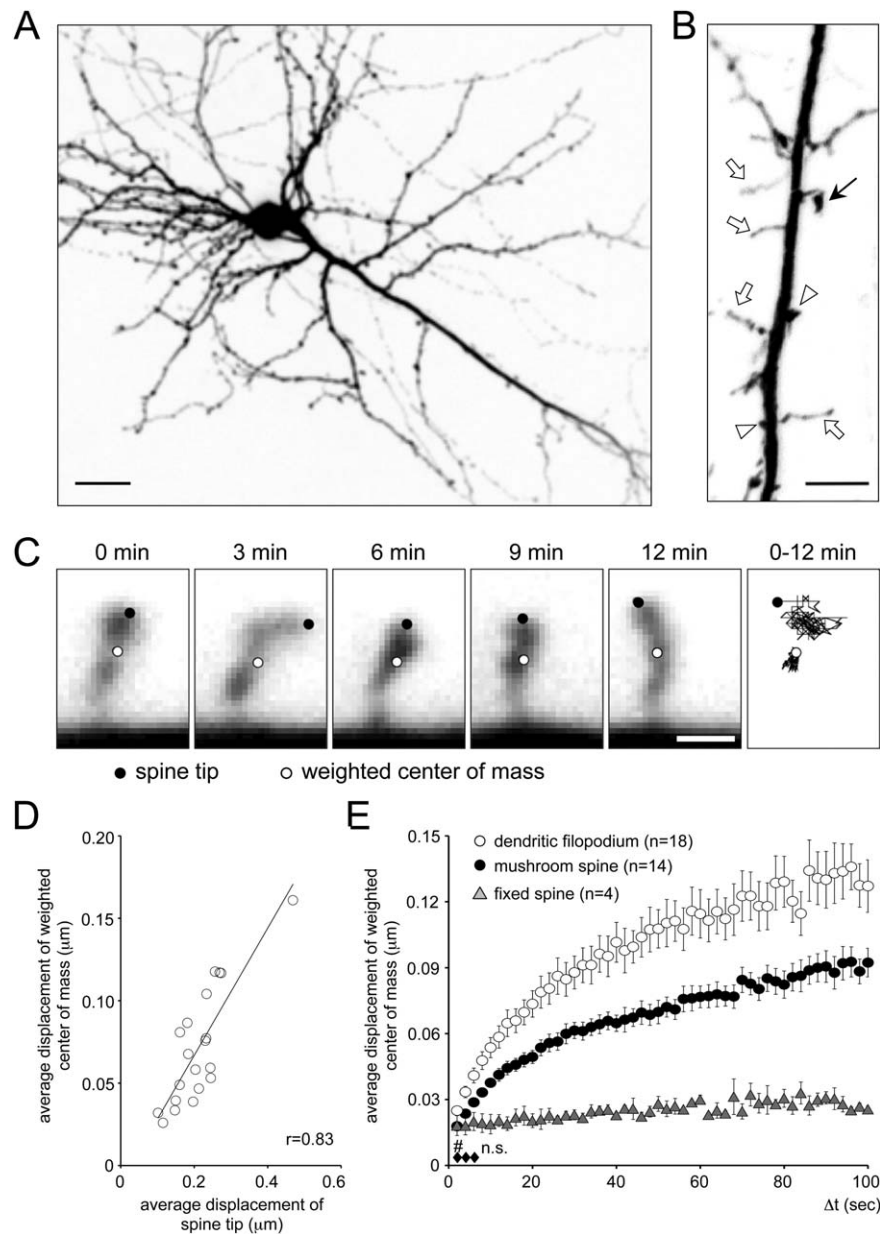


Figure 4. Application of the DFMA plugin on EGFP transfected hippocampal dendritic spines. (A) Inverted image of a hippocampal neuron expressing EGFP in culture (DIV10). Scale bar is 20 μm . (B) Inverted fluorescent image of a secondary dendrite of a hippocampal neuron. Arrowheads point at stubby spines, empty arrows indicate dendritic filopodia while black arrow highlights a mushroom spine. Scale bar is 5 μm . (C) Snapshots of inverted fluorescent images from a dendritic filopodium. Position of the manually defined spine tip is indicated by a black dot, while the position of the weighted CoM is represented by a white dot. Right image shows the cumulative trajectories of the tip or the weighted CoM within the analyzed 12 minutes. Elapsed time is indicated above the images. Scale bar is 1 μm . See also Movie 5. (D) Correlation between the average displacement of manually tracked filopodium tips and the average displacement of the weighted CoM ($n = 20$). Pearson correlation coefficient " r " is indicated above the x-axis. (E) Average displacement of the weighted CoM as a function of elapsed time between analyzed frames (Δt). Data were obtained from highly motile filopodia (open circles), more stable mushroom spines (filled circles) or from fixed cultures (gray triangles). Data points between the three groups are significantly different ($P < 0.05$) except as indicated by diamond shapes ($\Delta t = 2, 4$, and 6 seconds; fixed vs. mushroom spines) or a hash tag ($\Delta t = 2$ seconds; fixed vs. filopodia). Data represent mean \pm SEM.

structure (d) during the observation time ($d \sim \Delta t$), unbiased random walk is described by the $d^2 \sim \Delta t$ function (26,27). Data points fitted well to the $d^2 \sim \Delta t$ function (Supporting Information Fig. 1), in agreement with the trajectories displayed on Figure 4C. Values above $\Delta t > 20$ seconds showed

slightly ceased correlation with the $d^2 \sim \Delta t$ function, which is due to the limited degree of freedom of anchored structures possessing a limited length. We conclude that investigating spine or filopodium motility in time windows longer than 20 seconds underestimates real speed of movements.

CONCLUSIONS

The DFMA plugin provides an easy-to-use semi-automated application to acquire quantitative motility data from different types of dendritic protrusions. An obvious limitation of our plugin is that it works with single-plane image series, although dendritic protrusions are formed and change their shape in three-dimensional (3D). Determination of their real morphological parameters in time-lapse z-stack images, however, is not an easy task if the scanning speed, light exposure or the speed of analysis are limiting factors. Therefore, four-dimensional data sets (x, y, z, t) are often reduced to (x, y, t) by projecting image z-stacks. This method of analysis inevitably underestimates spine dynamics since movements in the z-direction are neglected; however, it has the advantage of improving image contrast (9,17). Our plugin can be useful in case of projected z-stack images, as well. It is important to emphasize that if the plugin is used on single z-stack (x, y, t) data sets, only those protrusions should be analyzed which are located and move parallel to the plane of observations.

Although the CoM is a virtual parameter, we provide synthetic and real biological evidences that the displacement of the weighted CoM reliably characterizes the motility of filopodium-like structures. Only a few cases are known when shape shifting of a structure is not correlated with the movement of its centroid (e.g., serpentine movement or perfect spherical growth), but they are not typical for dendritic protrusions. We also show that the usability of our plugin is limited by certain requirements (e.g., image noise and the rate of movement) and provide guidelines to determine acceptable background variance of image intensity values. Additionally, we propose a method to define the optimal time periods when the displacement of the analyzed structures exceeds the movement caused by unbiased noise.

As our method is rather insensitive to tiny changes along the surface of the spine heads, it is not suitable for analyzing smaller morphological changes, for example, membrane fluctuations of spine heads (see Movie 3). However, our plugin provides many advantages in case of highly motile filopodia: first, the position of weighted CoM can change frame-to-frame even when the area of the given structure remains the same (e.g., a square-like structure takes a rectangular shape). Second, as our method defines the involvement of a given pixel in the calculation of the CoM depending on the pixel intensity values using pre-set thresholds, the difficult task of exact edge definition is not required. This is especially helpful in case of low contrast images. Additionally, our method provides a fast and effective way for the quantitative analysis of image series: threshold and probability values are displayed in real time, therefore defining the optimal thresholds throughout the image series is easy. As calculation of the weighted CoM is an

automated process, our plugin provides a reliable and fast way compared with any methods of manual analyses.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to András Czirik for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Yuste R. Dendritic Spines. Cambridge, MA: MIT Press; 2010. 280 p.
2. Bhatt DH, Zhang S, Gan W-B. Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol* 2009;71:261–282.
3. Dailey ME, Smith SJ. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 1996;16:2983–2994.
4. Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: Evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 2003;23:7129–7142.
5. Yoshihara Y, De Roo M, Muller D. Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19:146–153.
6. Koh IYY, Lindquist WB, Zito K, Nimchinsky EA, Svoboda K. An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural Comput* 2002;14:1283–1310.
7. Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 2000;404:876–881.
8. Luikart BW, Zhang W, Wayman G a, Kwon C-H, Westbrook GL, Parada LF. Neurotrophin-dependent dendritic filopodial motility: A convergence on PI3K signaling. *J Neurosci* 2008;28:7006–7012.
9. Oray S, Majewska A, Sur M. Effects of synaptic activity on dendritic spine motility of developing cortical layer v pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 2006;16:730–741.
10. Shen Y, Liu S-S, Zhan M-Y, Luo J-H, Zhu L-J. Interleukin-2 enhances dendritic development and spinogenesis in cultured hippocampal neurons. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010;293:1017–1023.
11. Tashiro A, Yuste R. Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: Evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci* 2004;26:429–440.
12. Ziv NE, Smith SJ. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 1996;17:91–102.
13. Kayser MMS, Nolt MJM, Dalva MMB. EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron* 2008;59:56–69.
14. Tatavarty V, Das S, Yu J. Polarization of actin cytoskeleton is reduced in dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron. *Mol Biol Cell* 2012;23:3167–3177.
15. Chen W, Prithviraj R, Mahnke AH, McGloin KE, Tan JW, Gooch AK, Inglis FM. AMPA glutamate receptor subunits 1 and 2 regulate dendrite complexity and spine motility in neurons of the developing neocortex. *Neuroscience* 2009;159:172–182.
16. Korkotian E, Segal M. Regulation of dendritic spine motility in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001;21:6115–6124.
17. Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13438–13443.
18. Lordkipanidze T, Bikashvili T, Japaridze N, Zhvania M. The effect of kainic acid on hippocampal dendritic spine motility at the early and late stages of brain development. *Micron* 2013;49:28–32.
19. Srivastava DP, Woolfrey KM, Penzes P. Analysis of dendritic spine morphology in cultured CNS neurons. *J Vis Exp* 2011;53:e2794.
20. Verkuyil JM, Matus A. Time-lapse imaging of dendritic spines in vitro. *Nat Protoc* 2006;1:2399–2405.
21. Czöndör K, Ellwanger K, Fuchs YF, Lutz S, Gulyás M, Mansuy IM, Haussler A, Pfizenmaier K, Schlett K. Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 2009;20:2108–2120.
22. Thévenaz P, Ruttimann UE, Unser M. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process* 1998;7:27–41.
23. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676–682.
24. Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 1998;20:847–854.
25. Zhang S, Murphy TH. Ca(2+)-independent spine dynamics in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:334–344.
26. Berg HC. Random Walks in Biology. Princeton, NJ: Princeton University Press; 1983. 190 pp.
27. Schlett K, Czirik A, Tárnok K, Vicsek T, Madarász E. Dynamics of cell aggregation during in vitro neurogenesis by immortalized neuroectodermal progenitors. *J Neurosci Res* 2000;60:184–194.

AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program

Márton Gulyás^{1,2} · Norbert Bencsik³ · Szilvia Pusztai³ · Hanna Liliom³ · Katalin Schlett^{1,3}

Published online: 11 May 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Widely used behavioural investigation methods, such as the Morris water maze or fear conditioning tests, can be evaluated in several different ways. Commercially available software tools (e.g., Smart, Anymaze, etc.) as well as freely available programs are designed to fulfil certain pre-defined tasks with pre-defined methods.^{1, 2} Thus, they do not allow the modification of the applied algorithms and prevent further customisation. We aimed to establish the *AnimalTracker* application programming interface (API)³ in a way that its structure allows easy expansion with independent ImageJ applications/plugins, providing a widely useful toolkit for customized behavioural investigations and analyses.

The *AnimalTracker API* can analyse any image sequence compatible with ImageJ.⁴ The API has three main functional modules (see Fig. 1 and the website for detailed descriptions). The function of the *Tracker module*⁵ is to process video

recordings and to determine the observed object's XY coordinates in each frame. Each frame goes through a customizable processing chain (Fig. 1a). The function of the filtering step is to facilitate the binarization of the frames by decreasing image noise and/or removing the background. Besides several commonly used filters, a background subtractor filter is also provided to remove the static objects from each frame. During the binarization step, separation of the foreground from the background is performed. The postprocessing step serves to correct the errors of the binarization process, such as removing excess foreground pixels caused by image noise. In case of the filtering and postprocessing steps, algorithms can be expanded and concatenated freely and in an unlimited manner. During blob detection, the program searches for continuous foreground areas (so-called blobs). Ideally, the blob should represent the tracked animal only but visual artefacts may also be recognised as blobs. During the blob comparison step, the blob most closely matching the tracked object is selected by the Simple Distance Blob Comparator algorithm. Finally, the numerical output of the *Tracker module* provides the XY coordinates of the blob and can be exported as a text file. Custom processing chains created for different types of recordings can be saved and used as templates.

The *TrackAnalyzer module*⁶ is responsible for the extraction of different trajectory parameters measured during the recording (Fig. 1c). The module works with the XY position set provided by the *Tracker module* or can read any external text file containing trajectory data arranged in the required structure (X and Y coordinates separated by space, line-by-line). Calculation of the total time and time spent without movement as well as the distance performed within the zones (see below) are built-in features of the API. Additional parameters (such as angle preference in case of the Morris water maze plugin) can

¹ Shoji, H., Hagihara, H., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T. (2012). T-maze forced alternation and left-right discrimination tasks for assessing working and reference memory in mice. *Journal of Visualized Experiments*, (60).

² Huang, K. M., Cosman, P., Schafer, W. R. (2006). Machine vision based detection of omega bends and reversals in *C. elegans*. *Journal of Neuroscience Methods*, 158(2), 323–36.

³ <http://animaltracker.elte.hu>

⁴ <https://imagej.nih.gov/ij/>

⁵ <http://animaltracker.elte.hu/tracker>

✉ Katalin Schlett
schlett.katalin@ttk.elte.hu

¹ MTA-ELTE-NAP B Neuronal Cell Biology Research Group, Budapest H-1117, Hungary

² Department of Biological Physics, Eötvös Loránd University, Budapest H-1117, Hungary

³ Department of Physiology and Neurobiology, Eötvös Loránd University, Pázmány P. stny 1/C, Budapest H-1117, Hungary

⁶ <http://animaltracker.elte.hu/analyzer>

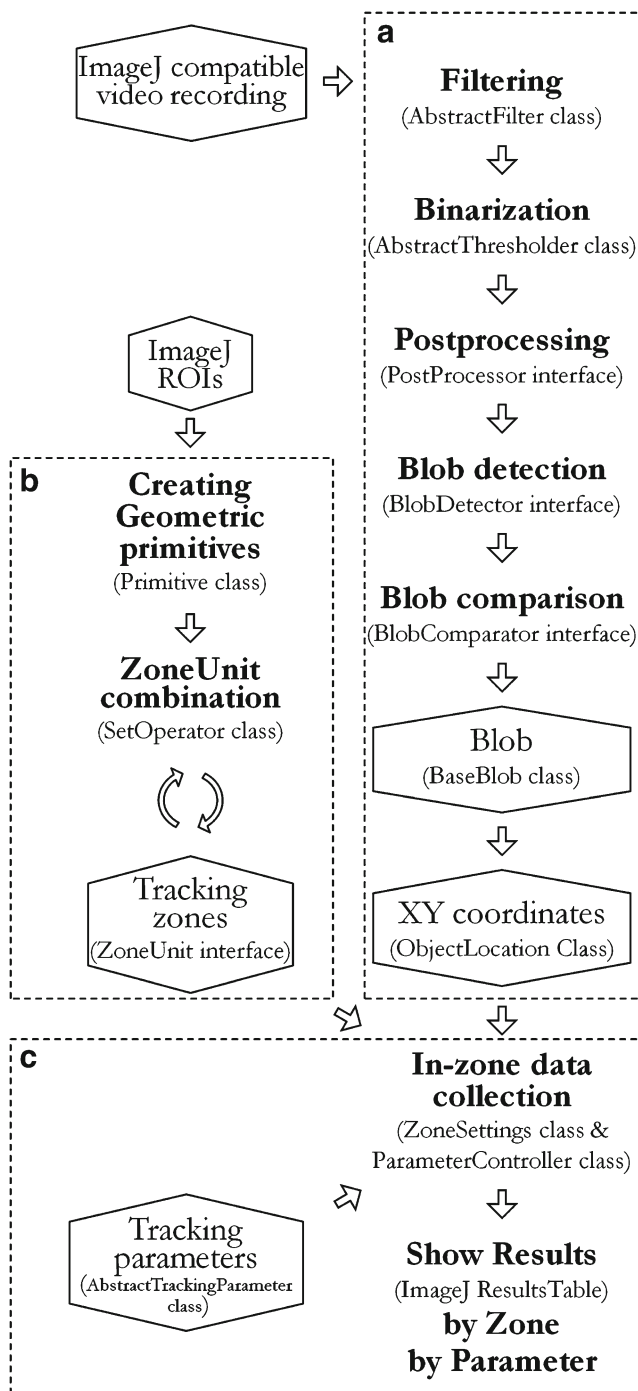


Fig. 1 Workflow of the *AnimalTracker* API. The API consists of three different modules: the *Tracker* module (a), the *ZoneDesigner* module (b) and the *TrackAnalyzer* module (c). Hexagons indicate data structures. Processing steps are in bold, while text in parentheses refers to the relevant programming components

also be added. Numerical output values are presented as ImageJ Results tables, grouped either by zone or by parameter.

The *ZoneDesigner* module⁷ is used to easily define the zones of interest within the observation area, using basic

ImageJ ROIs as building blocks (oval, rectangle, polygon, freehand). These shapes can be combined freely, in repetitive cycles (Fig. 1b). Thus, any kind of user-defined, customized zone definition is possible.

Graphical outputs have been integrated into all three modules, providing the possibility to display tracking paths between any analysed frames. Importantly, the applied settings of the modules can be saved as templates so bulk analyses on similarly recorded image sequences can be carried out easily.

Based on the built-in graphical user interfaces of the *AnimalTracker* API, the modules can be used freely, without any programming knowledge. However, customized plugins can be created with minimal programming skills, as demonstrated by two plugins suitable for analysing spatial learning and memory in laboratory rodents. The Radial maze (RM) and the Morris water maze (MWM) plugins are also available within the API example package.⁸ During the radial maze test, rodents are trained to find small baits hidden at the end of certain arms. Memory formation is evaluated based on the elapsed time and path needed to find all baits.⁹ The Morris water maze is a widely used test to analyse hippocampus-dependent spatial memory formation by training mice or rats to escape onto a hidden platform within a round pool. Learning efficacy is determined according to the elapsed time and swim path executed in the search for the platform.¹⁰ The *ZoneDesigner* module is used to determine the central zone and the arms (RM plugin) or to create 4 inner and 4 outer quadrants within a circular pool (MWM plugin). Based on the XY position data provided by the *Tracker* module, the *TrackAnalyzer* module calculates the distance covered, the elapsed time, the immobility time and the velocity of the movement within the defined zones. In order to highlight swimming orientation, angle preference values (the degree between the direction of swimming and the location of the platform) are also calculated by the MWM plugin. Results are grouped and calculated either by zone or by parameter within the Results Table, and can be analysed further by any suitable external programs (e.g., Excel or Matlab).

The *AnimalTracker* API provides a useful toolkit for end users as well as for programmers. While the main modules are readily usable without any programming skills, the abstract structure of the API allows easy customisation as well as

⁸ <http://animaltracker.elte.hu/plugins>

⁹ Gellért, L., Varga, D., Ruszka, M., Toldi, J., Farkas, T., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Kis, Z. (2012). Behavioural studies with a newly developed neuroprotective KYNA-amide. *Journal of Neural Transmission*, 119, 165–172.

¹⁰ Chen, G., Chen, K. S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S. J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S. B., Morris, R. G. (2000). A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408(6815), 975–9.

⁷ <http://animaltracker.elte.hu/zone>

user-defined expansions even with limited programming knowledge. Although the API has been developed for single object tracking, its structure provides the possibility for integrating multi-target tracking options, as well. We hope that the *AnimalTracker API* becomes a useful tool for the scientific community wishing to create customised image sequence tracking analyses.

Information Sharing Statement

AnimalTracker (RRID:SCR_014397) is implemented in Java as a part of ImageJ (RRID:SCR_003070).⁴ It is an open-

source software and is freely available at the AnimalTracker website.³ The website contains detailed descriptions of the API, a tutorial video and two sample recordings for testing the program. A community forum is also provided for users.

Acknowledgments This work was supported by the Hungarian Brain Research Program [grant number KTIA_NAP_13-2014-0018]; and the Hungarian Scientific Research Fund [grant number K81934] to K.S. All experiments were complied with local guidelines and regulations for the use of experimental animals (PEI/001/1108-4/2013 and PEI/001/1109-4/2013), in agreement with the European Union and Hungarian legislation. The authors have no conflicts of interest to declare. The authors thank Emese Mária Rácz for designing the logo.

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Bencsik Norbert**

MTMT-azonosító: **10032756**

A doktori értekezés címe és alcíme:

A protein kináz D hatása a dendrittüskék aktin vázrendszerének stabilizálására és a tanulási folyamatokra

DOI-azonosító³⁹: **10.15476/ELTE.2016.095**

A doktori iskola neve: **Biológia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Idegtudomány és humánbiológia**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **Dr. Schlett Katalin, PhD; habilitált egyetemi docens**

A témavezető munkahelye: **ELTE-TTK - Élettani és Neurobiológiai Tanszék**

II. Nyilatkozatok

A doktori értekezés szerzőjeként⁴⁰

a) hozzájárok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Dékáni Hivatalának Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportja ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴¹

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (datum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴²

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.⁴³

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2016. június 02.

.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

³⁸ Beiktatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat. Hatályos: 2014. VII. 1. napjától.

³⁹ A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

⁴⁰ A megfelelő szöveg aláhúzendő.

⁴¹ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományos doktori tanácsához a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

⁴² A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

⁴³ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.